

**Isolierung, Strukturaufklärung und Biosynthese
phytotoxisch wirksamer Anthrachinon-Derivate produziert
von *Ramularia collo-cygni* und *R. uredinicola***



D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Biol. Sebastian Miethbauer
geboren am 29. September 1976 in Erfurt

Jena
April 2008

Gutachter

1. HDoz. Dr. Bernd Liebermann (Jena)
2. Prof. Dr. Christian Hertweck (Jena)
3. Prof. Dr. Matthias Hamburger (Basel/Schweiz)

Tag der öffentlichen Disputation: 18. Juli 2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 <i>Ramularia collo-cygni</i> (CAV.) SUTTON & WALLER	2
1.2 <i>Ramularia uredinicola</i> KHODAP. & U. BRAUN	7
1.3 Phytotoxine	8
1.4 Zielstellung	10
2 Methoden und Material	11
2.1 Pilzkulturen	11
2.2 Kultivierung	12
2.3 Isolierungsmethoden	13
2.3.1 Extraktion	13
2.3.2 Vorfraktionierung an Kieselgel	14
2.3.3 Präparative HPLC	14
2.3.4 Sephadex® LH-20	15
2.4 Analytische Methoden	16
2.4.1 Chromatographie	16
2.4.2 Spektroskopie	17
2.5 Wachstums- und Bildungskinetik bei <i>R. collo-cygni</i>	20
2.6 Stämme- und Artenvergleich	20
2.7 Molekularbiologische Arbeiten	21
2.8 Rubellin-Nachweis <i>in vivo</i>	24
2.9 Untersuchungen zur Biosynthese	25
2.10 Biologische Aktivität	27
2.10.1 Bioassay an <i>Hordeum vulgare</i> L.	27
2.10.2 Photodynamische Aktivität	28

2.10.3 Antibiotische Wirkung	29
2.10.4 Proliferations- und Zytotoxizitätsassays	30
2.10.5 Tau-Aggregation	36
2.10.6 Antivirale Wirkung	36
2.11 Geräte und Chemikalien	38
2.11.1 Geräte	38
2.11.2 Stationäre Phasen	41
2.11.3 Laufmittel	42
2.11.4 Chemikalien, Pufferlösungen, Medien	43
2.11.5 Primer und Reagenzienkits	45
2.11.6 Zelllinien und Virenstämme	46
3 Ergebnisse und Diskussion	48
3.1 Extraktion und Isolierung	48
3.2 Analytik und Strukturaufklärung	50
3.2.1 Chromatographische Daten	50
3.2.2 Spektroskopische Untersuchungen	53
3.2.3 Zusammenfassende Diskussion zur Strukturaufklärung	57
3.3 Strukturformeln (Übersicht)	77
3.4 Wachstums- und Bildungskinetik bei <i>R. collo-cygni</i>	79
3.5 Stämme- und Artenvergleich hinsichtlich der Rubellin-Produktion	82
3.6 Spektrum der von <i>R. collo-cygni</i> und <i>R. uredinicola</i> gebildeten Anthrachinon-Derivate	85
3.7 Molekularbiologische Arbeiten	87
3.7.1 Phylogenetische Untersuchungen des <i>Ramularia</i> -Artkomplexes	87
3.7.2 Analyse der PKS-Gene von <i>R. collo-cygni</i> und <i>R. uredinicola</i> - ein Einstieg	91
3.8 Rubellin-Nachweis <i>in vivo</i>	96
3.9 Untersuchungen zur Biosynthese	97

3.10	Biologische Aktivität	102
3.10.1	Bioassay an <i>Hordeum vulgare</i> L.	103
3.10.2	Photodynamische Aktivität	104
3.10.3	Antibiotische Wirkung	108
3.10.4	Proliferations- und Zytotoxizitätsassays	111
3.10.5	Tau-Aggregation	117
3.10.6	Antivirale Wirkung	118
3.10.7	Aussagen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen	119
4	Zusammenfassung und Ausblick	120
5	Summary	124
6	Literatur	127
	Anhang	143
	Danksagung	169
	Liste wissenschaftlicher Publikationen und Tagungsbeiträge	171
	Lebenslauf	173
	Ehrenwörtliche Erklärung	174
	Thesen zur Dissertation	175

Abkürzungsverzeichnis

ACP	Acyl-Carrier-Protein
Aqua dest.	<i>aqua destillata</i>
AS	Aminosäure
AT	Acyltransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AU	<i>absorption units</i> (Absorptionseinheiten)
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaare
CC ₅₀ , CC ₁₀	<i>cytotoxic concentration</i> (halbmaximale bzw. zehntelmaximale zytotoxische Konzentration)
COSY-dqf	<i>correlated spectroscopy with double quantum filter</i>
CFU	<i>colonie forming unit</i> (Kolonie-bildende Einheit)
CSS	<i>charcoal-dextran stripped serum</i> - Dextran-Aktivkohle-behandeltes fötales Kälberserum
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DH	Dehydratase
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ER	Estrogenrezeptor
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
FAS	<i>fatty acid synthase</i>
FC	<i>flash liquid chromatography</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
GI ₅₀	<i>growth inhibition</i> (halbmaximale Wachstumshemmung)
Glc	Glucose
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlation</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigchromatographie)

HR-ESI	<i>high resolution electron spray ionisation</i>
Hz	Hertz (Frequenz)
IC ₅₀	<i>inhibition concentration</i> (halbmaximale Hemmung)
IR	Infrarot
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
J	Kopplungskonstante/Kopplung
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
KBr	Kaliumbromid
KF	Kulturfiltrat
KG60	Kieselgel 60
KMB	α -Keto-4-Thiomethylbuttersäure
KR	Ketoreduktase
KS	Ketosynthase
LDH	Lactatdehydrogenase
leg.	<i>legere</i> (lat. gesammelt von)
LM	Laufmittel
LSU	<i>large subunit</i> (große Untereinheit)
MEM	<i>Eagle's minimal essential medium</i>
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MIC	<i>minimal inhibitory concentration</i> (minimale Hemmkonzentration)
MRSA	Methicillin-resistenter Stamm
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid, Thiazolylblau
My	Mycel
NaAc	Natriumacetat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NJ	<i>Neighbor-Joining</i> -Distanzverfahren
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanzspektroskopie)
n. n.	nicht nachweisbar
n. u.	nicht untersucht
NPS	nicht-ribosomale Peptidsynthase
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i>
OD	optische Dichte

p. a.	<i>pro analysi</i> (für die Analyse)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PKS	Polyketidsynthase
PMS	Phenazinmethosulfat
PP	<i>phosphopantetheine attachment site</i> (Acyl-Carrier-Protein bzw. Thiolierung von NPS)
ppm	<i>parts per million</i>
PrOH	Propanol
P/S	Penicillin/Streptomycin
RA	Radioaktivität
RF	<i>response factor</i> (Resonanzfaktor)
R _f	<i>retardation factor</i> (Retentionsfaktor)
RLSD	<i>Ramularia leaf spot disease</i> (Ramularia-Blattfleckenkrankheit)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RP	<i>reversed phase</i> (Umkehrphase)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
SSU	<i>small subunit</i> (kleine Untereinheit)
THF	Tetrahydrofuran
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
UV/Vis	Ultraviolett/Visible
VRSA	Vancomycin-resistenter Stamm
XTT	2,3-Bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilid-Natrium
zpE	zytopathischer Effekt

1 Einleitung

Als eine der ältesten Kulturpflanzen wurde die Gerste schon vor mehr als 5000 Jahren durch die Sumerer angebaut. Sie leitet sich von den Wildarten *Hordeum spontaneum* KOCH und *H. agriocrithon* ÅBERG ab. Grundsätzlich werden zwei Typen von Formenreihen unterschieden, zum einen die zweizeilige Gerste und zum anderen mehrzeilige Sorten, wobei die Körner hier in Reihen zu 4 - 6 Zeilen stehen. Die Bundesrepublik Deutschland steht 2005 mit einer jährlichen Gesamtproduktion von 11,6 Mio. t hinter der Russischen Föderation und Kanada weltweit auf Platz drei (FAO, 2008). Einen großen Anteil setzt in Europa die Brau- bzw. Spirituosenindustrie um. Aufgrund des erhöhten Stärkeanteils und dem verhältnismäßig niedrigen Anteil an Eiweiß ist die zu den *Poaceae* gehörende Getreideart weniger für die Mehlgewinnung als vielmehr für die Futterindustrie von Bedeutung (Geisler, 1988). Durch die großen Produktionsmengen wird Gerste, wie andere Getreidearten auch, in Monokulturen angebaut. Der erhöhten Gefahr von Befall durch tierische Schädlinge oder phytopathogene Pilze begegnet die Landwirtschaft mit Insektiziden bzw. Fungiziden oder auch durch Resistenzzüchtungen. Diese Maßnahmen begünstigen jedoch immer wieder neue Erreger und führen somit zum vermehrten Auftreten neuer Krankheiten. In Mitteleuropa herrschen aufgrund der klimatischen Bedingungen vor allem fungale Erreger vor. Grundsätzlich lassen sich bei Pilzen zwei parasitäre Verhältnisse unterscheiden. Neben den obligat pathogenen Erregern, welche hochspezialisiert und angepasst auf einem ausschließlich lebenden Substrat parasitieren (Bsp. *Blumeria graminis* (DC.) SPEER, *Bremia lactucae* REGEL oder einige *Puccinia*-Arten), gibt es die weitaus größere Gruppe der nichtobligaten bzw. fakultativ pathogenen. So haben sich entsprechend unterschiedliche Ernährungsstrategien ausgebildet. Sie reichen von Biotrophie, wobei sich der Erreger ausschließlich von lebenden Pflanzenzellen ernährt, über Perthotrophie bis hin zu Nekrotrophie. Während nekrotrophe Organismen sich von bereits abgestorbenem Gewebe ernähren, schwächen perthotroph lebende den Wirt mittels Toxinen oder hydrolytischen Enzymen, um ihn anschließend besiedeln zu können. Die Penetration erfolgt meist durch über Wind oder Wasser verbreitete Sporen, welche über einen Keimschlauch in den Wirt einwachsen. Nach Bildung von entsprechenden Sekundärmetaboliten entstehen während der Parthenogenese chlorotische und nekrotische Zonen. Diese Bereiche sind in der Regel frei vom Verursacher. Die Kompartimentierung und die damit verbundene Permeabilität werden jedoch aufgehoben, ein Efflux von niedermolekularen Verbindungen ist die Folge. Auf diese Weise hat sich der Pilz seine Nahrungsressource

erschlossen und kann das geschwächte Gewebe weiter besiedeln (Schlösser, 1997; Hoffmann et al., 1994).

Mitte der 80er Jahre wurde in Österreich ein vermehrtes Auftreten von Symptomen beobachtet, die bis *dato* in die Kategorie der sogenannten nicht-physiologischen Blattflecken gestellt wurden. Genauere Untersuchungen bestätigten jedoch einen ersten Verdacht, dass es sich dabei um eine echte Mykose handeln könnte. Als Verursacher dieser neuen Krankheit konnten Huss et al. (1987) den Pilz *Ramularia collo-cygni* bestimmen.

1.1 *Ramularia collo-cygni* (CAV.) SUTTON & WALLER

Systematische Stellung

Die Erstbeschreibung des Pilzes erfolgte schon 1893 durch Cavara für die Region Norditalien. Nach zwischenzeitlicher Zuordnung zur Gattung *Ovularia* (Spargue, 1946) stellten Sutton & Waller (1988) den Pilz endgültig zur *Ramularia*-Gattung. Spätere molekulargenetische Untersuchungen bestätigten diese morphologischen Zuordnungen. Aus systematischer Sicht muss *R. collo-cygni* zu den *fungi imperfecti* gestellt werden, da der endgültige Nachweis einer teleomorphen Form noch aussteht. Crous et al. (2000) und Braun (1991, 1998) vermuten jedoch aufgrund der gehäuften Zuordnungen *Ramularia* (Anamorphe)/*Mycosphaerella* (Teleomorphe), dass, wenn die geschlechtliche Form existiert, sie in der *Mycosphaerella*-Gruppe zu finden sein müsste. Weitere Erkenntnisse hinsichtlich der systematischen Zuordnung erhielten Goodwin et al. (2001) über molekulargenetische Untersuchungen der ITS-Region (*internal transcribed spacer*). Salamati & Nyman (2008) beobachteten auf älteren Agar-Platten ein spermogoniales Stadium (*Asteromella*-Typ), womit die direkte Verwandtschaft zu *Mycosphaerella* auch auf morphologischer Ebene als wahrscheinlich zu betrachten ist.

Morphologie und Biologie des Pilzes

Die Etymologie des Pilzes leitet sich aus den lateinischen Wörtern für Hals (*collum*) und Schwan (*cygnus*) ab und beschreibt die in Abbildung 1.1 zu sehenden typischen Konidienträger (Huss et al., 1992). An diesen schwanenhalsförmig gebogenen Trägerelementen befinden sich solitäre, oval bis ellipsoid geformte Konidien, deren Oberfläche feinwarzig strukturiert ist. Die Größenangaben der anemochor bzw. hydrochor verbreiteten Konidien schwanken in der Literatur zwischen 6 - 12 x 5 - 9 µm bei Braun (1998), 9,5 - 11,5 x 4,5 - 6 µm bei Sutton (1991) bis hin zu den Angaben von Huss & Neuhold (1995) mit nur 8 x 4,4 µm. Die

Konidienträger sind hyalin, septiert (ein bis dreifach ab der Basis), glatt und 30 - 56 μm (Sutton, 1991) bzw. 15 - 70 μm (Braun, 1998) lang. Sie stehen als Büschel zu etwa 15 Trägern zusammen und wachsen aus den Stomata der Wirtspflanzen heraus.

Die Lebensweise dieses phytopathogenen Pilzes kann als perthotroph bzw. fakultativ parasitisch angesehen werden (Braun, 1998). Das Wirtsspektrum scheint auf Gräser (*Poaceae*) beschränkt zu sein, wobei Nachweise für Gerste, Roggen und diverse Wildgräser wie z. B. Mäusegerste erbracht worden sind (Sachs, 2002; Huss & Sachs, 1998). Ein Nachweis an Dicotyledonen beschränkt sich auf *Cannabis sativa* L. (Sutton, 1991).

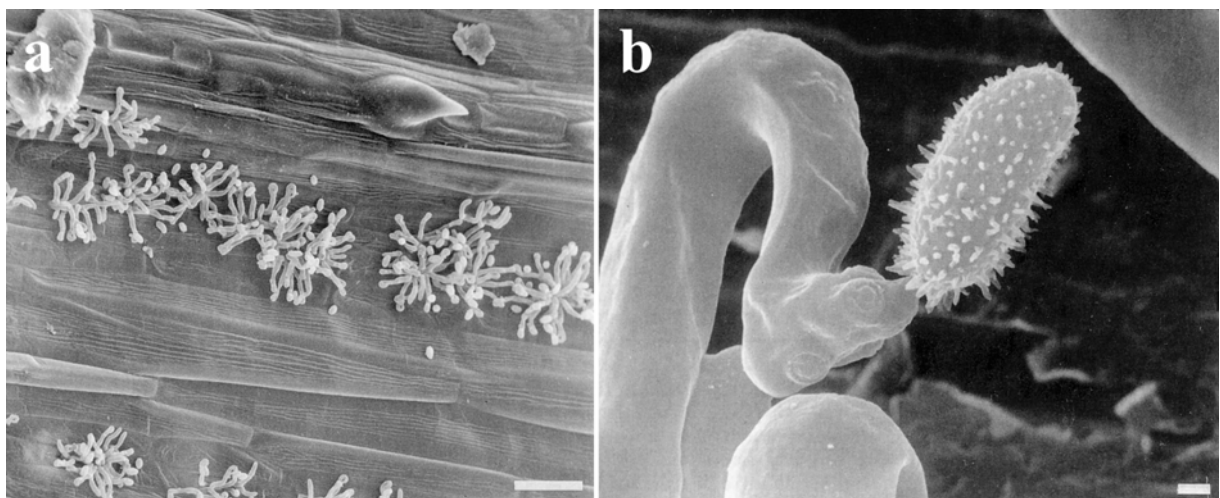


Abbildung 1.1: Konidienträgerbüschel von *R. collo-cygni*, aus den Stomata von *H. vulgare* hervorwachsend (a; Maßstrich = 100 μm). Die charakteristisch schwanenhalsartig geformten Konidienträger sind in (b) vergrößert dargestellt (Maßstrich = 1 μm) (verändert aus Huss et al., 1992).

RLSD - Die Sprenkelkrankheit der Gerste

Bei der Sprenkelkrankheit der Gerste handelt es sich offenbar um ein globales Problem. Sie konnte bereits in Österreich, Schweiz, Deutschland, Dänemark, Tschechien, Irland, Schottland, Norwegen, Italien, Neuseeland, Mexiko, Argentinien und Uruguay nachgewiesen werden (Huss et al., 1992; Tschöpe & Sachs, 2001; Sachs, 2006; Salamati & Raitan, 2007; Walters et al., 2008).

Nach einem Befall mit *R. collo-cygni* treten mit Beginn der Blüte die ersten punktförmigen Aufhellungen und Nekrosen an den Blattspreiten der zweiten und dritten Blattetage auf. Die Gerstenblätter (Abbildung 1.2) weisen nach wenigen Wochen eine dichte, feine Sprenkelung mit gleich großen, anfangs kastanienbraunen, später schwarzbraunen Flecken mit chlorotischem Hof auf (Sachs, 2002). Die Flecken sind in der Breite durch die Blattnervatur begrenzt, meist nur 1 - 2 mm lang und können bei starkem Befall ineinander übergehen. Für

diese Symptome sind möglicherweise aktiv sezernierte Phytotoxine verantwortlich. Selbst nach der Ernte sind die Flecken auf dem Stroh nachweisbar. Seltener sind diese Symptome auch auf den Blattscheiden, Sprossachsen, Grannen und Körnern zu finden (Huss et al., 1992). Während des rasanten Verlaufs der Krankheit kommt es zum Vergilben vom Blattrand nach innen und zum Absterben der betroffenen Pflanzenteile. Bevorzugt an der Blattunterseite bilden sich kleine weiße Tupfen, die mit der Lupe erkennbar sind. Es handelt sich hier um die Konidienträgerbüschel, die aus den Stomata ragen (Abbildung 1.1a).

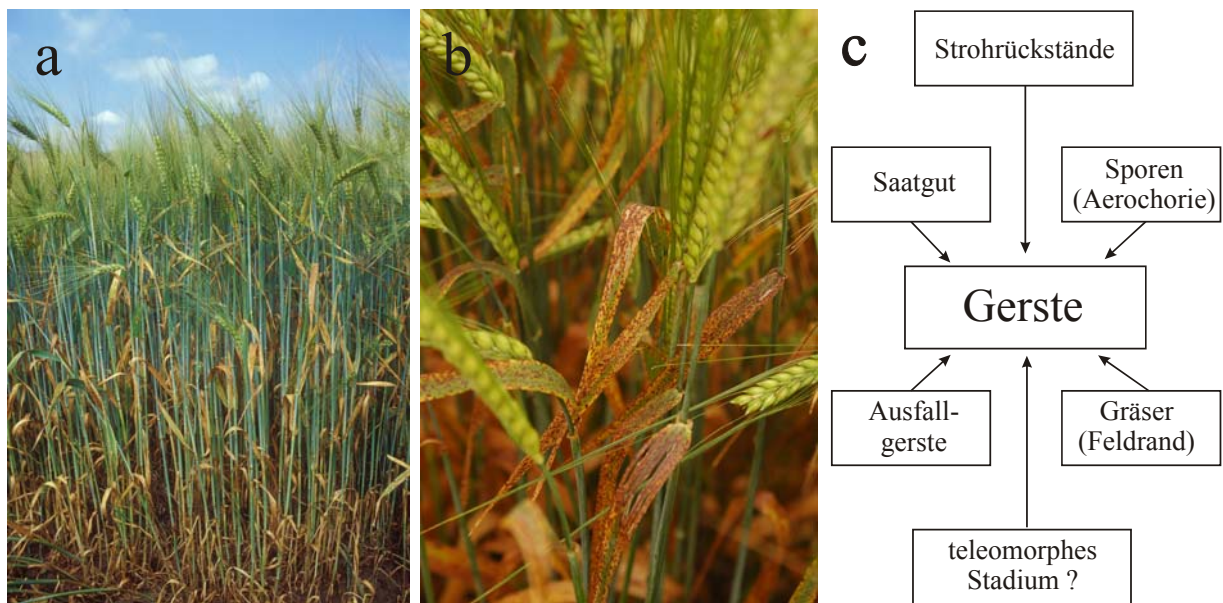


Abbildung 1.2: Symptome der RLSD (*Ramularia leaf spot disease*) an *H. vulgare*. a) Gesamtansicht, b) Detailansicht der oberen Blattetagen (Foto: T. Balz, Syngenta Agro GmbH, Juli 2004), c) Infektionsquellen von *R. collo-cygni* (verändert nach Walters et al., 2008).

Temperaturverlauf und Sonneneinstrahlung üben einen wesentlichen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Symptomausbildung aus (Makepeace et al., 2007). Bei Temperaturen von 18 - 22 °C und intensiver Sonneneinstrahlung findet eine beschleunigte Nekrosenbildung statt. Kühles Wetter mit geringer Sonneneinstrahlung verlangsamt den Prozess, verhindert ihn jedoch nicht (Sachs et al., 1998).

Nach dem Abreifen der Gerste werden auch andere Getreidearten und einige Gräser befallen. *R. collo-cygni* überwintert möglicherweise auf der Wintergerste und infiziert von der unteren Blattetage die darüber liegenden. Die Symptome treten mit der Blüte der Wintergerste und 1 - 2 Wochen später auch an der Sommergerste auf (Sachs et al., 2002). Offensichtlich wird der Pilz auch mit dem Saatgut verbreitet. *R. collo-cygni* konnte hier über PCR-Methoden nachgewiesen werden (Havis et al., 2006). Die Übertragung von Wintergerste auf Sommer-

gerste kann nach Frei et al. (2007) genauso wie die Infektionsquelle Ausfallgerste als gesichert angesehen werden. Aus den nachgewiesenen Infektionsquellen und den molekularbiologischen Untersuchungen von Frei et al. (2007) bzw. Havis et al. (2006) entwickelten Walters et al. (2008) ein Lebenszyklus-Schema für *R. collo-cygni* (Abbildung 1.3). Es gibt noch eine Reihe weiterer möglicher Infektionsquellen. Zum Teil werden auch Zwischenwirte diskutiert. So konnten beispielsweise Sporen des Pilzes an Blättern von *Quercus robur* L. über *Real-time-PCR* nachgewiesen werden (Heuser & Zimmer, 2002). Um wirkungsvolle Bekämpfungsstrategien entwickeln zu können, sind Kenntnisse über den genauen Lebenszyklus von *R. collo-cygni* von großer Bedeutung.

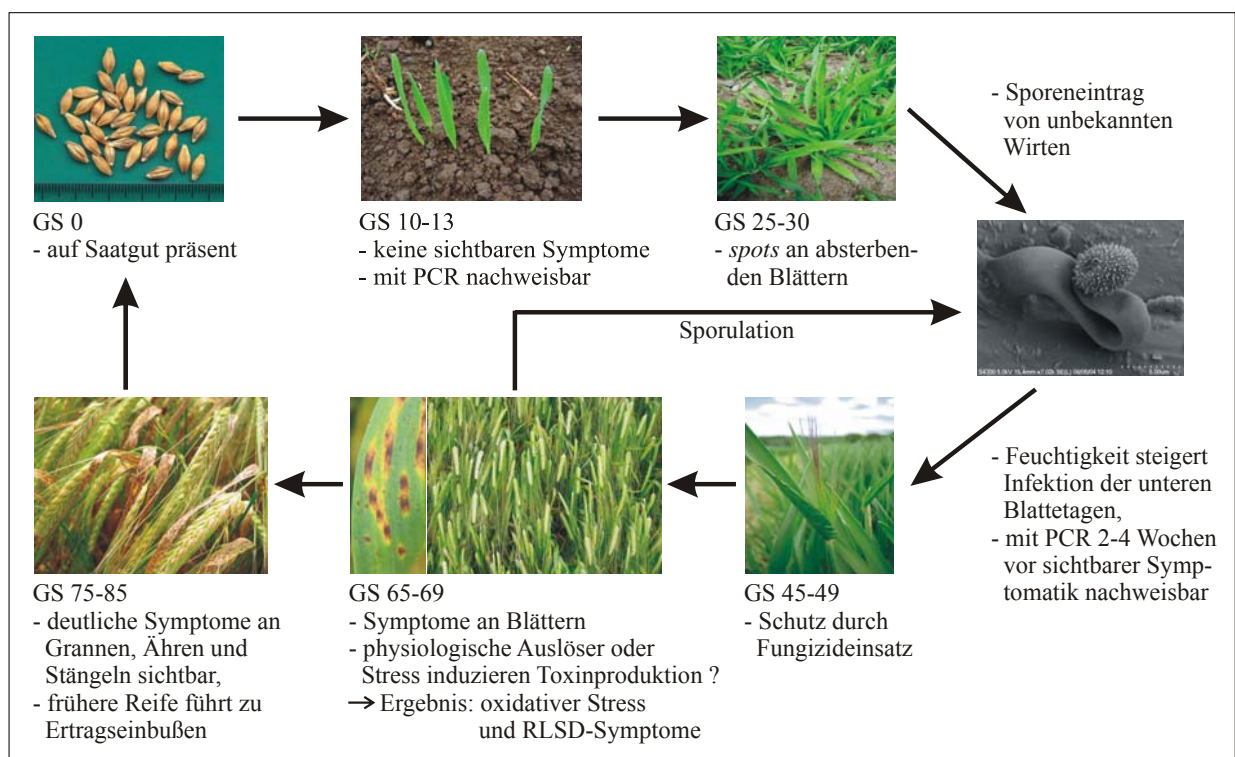


Abbildung 1.3: Lebenszyklus von *R. collo-cygni* verändert nach Walters et al. (2008). Die Einteilung der Wachstumsstadien (GS0 – GS85) erfolgte nach Zadok et al. (1974).

Wirtschaftliche Bedeutung

Die Symptome der RLSD können leicht mit denen anderer Gerstenkrankheiten wie z. B. der Netzfleckenkrankheit (*Pyrenophora teres* DRECHS.) oder physiologischen Blattflecken verwechselt werden (Sachs et al., 1998), auch liegen oftmals Mischinfektionen vor. Bei Befall mit *R. collo-cygni* reifen die Gerstenbestände in Folge der Pflanzenschäden 10 - 14 Tage früher ab, wodurch die Kornfüllung vorzeitig unterbrochen wird. Es kommt somit unter anderem zur Abnahme der Kornqualität (Huss et al., 1992; Raiser, 1999). An der Versuchsstation Lambach-

Stadl-Paura in Österreich wurden Ertragseinbußen bei der Wintergerste von 16 % und bei Sommergerste von 11 % ermittelt (Huss & Sachs, 1998). Amelung et al. (1999) geben für Österreich generell Einbußen von 10 - 20 % an, wobei Sortenunterschiede festgestellt werden konnten. In Großbritannien beliefen sich die Ernteverluste beispielsweise 2004 auf 0,4 t/ha (Walters et al., 2008). Die veränderte Zusammensetzung der Inhaltsstoffe des Korns könnte Einfluss auf Mälzeigenschaften der Gerste haben und die Bier- und Whiskyqualität beeinträchtigen (Sachs, 2002). Versuche an oben genannter Station in Österreich mit dem Fungizid Folicur[®] ergaben nach Huss & Neuhold (1995) eine Ertragssteigerung um 13 - 16 % im Vergleich zu befallenen unbehandelten Feldern. Die Optimierung der Maßnahmen für eine gezielte und wirtschaftliche Bekämpfung setzt eine bessere Kenntnis der Epidemiologie und der biotischen und abiotischen Einflussfaktoren voraus (Heß et al., 2007). Da auch nicht-fungizide Einflussfaktoren, wie das Entwicklungsstadium des Wirtes die Etablierung von *R. collo-cygni* beeinflussen, müssen diese bei einer integrierten Bekämpfung berücksichtigt werden (Sherdian, 2000; Harvey, 2002; Oxley et al., 2007).

Insgesamt gesehen ist der durch die Krankheit bedingte volkswirtschaftliche Schaden nicht unerheblich, zudem wurde die Bedeutung von *R. collo-cygni* in der Vergangenheit stark unterschätzt.

1.2 *Ramularia uredinicola* KHODAP. & U. BRAUN

Diese Art wurde erst 2005 durch Khodaparast & Braun im Iran (Provinz Guilan) entdeckt und aus morphologischen Gesichtspunkten der Gattung *Ramularia* zugeordnet. Die Caespituli treten nur auf den Uredosori einer noch nicht bestimmten *Melampsora*-Art (Uredinomyces) in Erscheinung. Da dieser Rostpilz wiederum auf *Salix babylonica* L. parasitiert, kann die Lebensweise von *R. uredinicola* als hyperparasitisch angesehen werden.

Das Mycel wächst oberflächlich, ist jedoch in die Sori eingebettet. Die Hyphen sind 1,5–3 µm breit, septiert, dünnwandig und glatt bis strukturiert. Die Enden sind gerundet bis zugespitzt mit 1–4 auffälligen Hila. In der Regel ist das Mycel hyalin, wobei ältere Hyphen blassrot werden können. Die Konidien treten in verzweigten Ketten oder einzeln in Erscheinung. Sie sind elliptisch bis eiförmig oder spindelförmig und 4–15 (21) x 2–4 (5) µm groß. Die Größe der Konidienträger hingegen beträgt (10) 20–80 (120) x 2–4 µm. Sie sind ebenfalls septiert, glatt, hyalin und stehen in schmalen bis mäßig langen Büscheln zusammen, selten auch einzeln (Abbildung 1.4).

R. uredinicola unterscheidet sich morphologisch nur gering von den bisher bekannten hyperparasitär lebenden *Ramularia*-Arten auf *Melampsora* sp. bzw. *Salix babylonica*. *R. uredinis* (W. VOSS) SACC. z. B. unterscheidet sich durch unverzweigte Konidienträger und bildet analog zu *R. coleosporii* SACC. und *R. uredinearum* HULEA keine rötlichen Pigmente in alternden Hyphen. Nur die Art *R. rosea* (FUCKEL) SACC. weist eine ähnliche Fähigkeit auf, wobei es sich hierbei um eine rein parasitisch auf *Salix* lebende Art handelt, deren Mycel oft neben, aber nie auf den Uredosori von *Melampsora* zu finden ist. Khodaparast & Braun (2005) nehmen an, dass die Rotfärbung der Hyphen mit der Produktion von Sekundärmetaboliten in Verbindung steht.

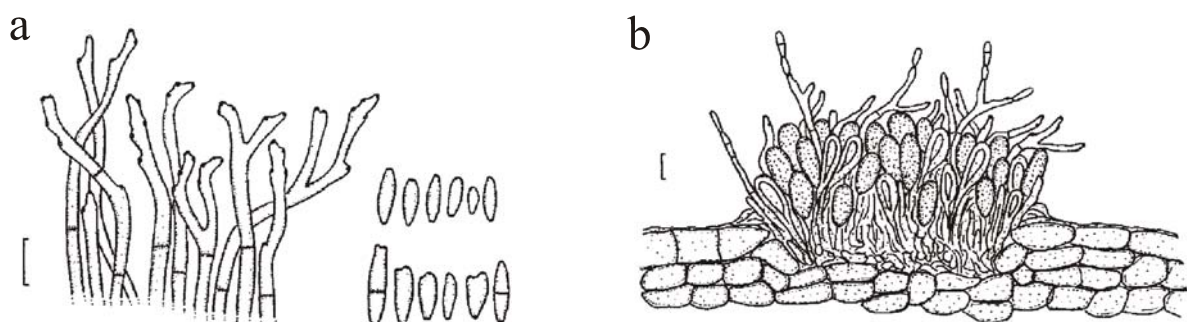


Abbildung 1.4: Morphologie von *R. uredinicola*. a) Konidienträger mit einzelnen Konidien, b) Querschnitt durch eine infizierte Uredospore von *Melampsora* sp.; Skala 10 µm (verändert nach Khodaparast & Braun, 2005).

1.3 Phytotoxine

Laut Definition sind Phytotoxine Sekundärmetabolite, die aktiv von Pilzen und Bakterien sezerniert werden und pathogen an bestimmten Organismen wirksam werden. Viele bisher bekannte Vertreter dieser Phytopathogenen haben die Fähigkeit, toxische Sekundärmetabolite zu produzieren, welche an der Symptomausprägung von Mykosen bzw. Bakteriosen beteiligt sind. Einige dieser Verbindungen gelten als echte Toxine, da sie unmittelbar eine schädigende Wirkung an den betreffenden Zellen hervorrufen können. Andere Toxine wirken auf die entsprechenden Zellen über eine Hemmung bestimmter Stoffwechselprozesse im Wirt, woraus u. a. apoptotische Prozesse resultieren (Panaccione et al., 2002). Oftmals werden diese Sekundärmetabolite nicht nur zur Sicherung der Nahrungsgrundlage bzw. zur Infektion oder allgemein einer Schwächung des Wirtes sezerniert, sondern auch zur Abwehr von Nahrungskonkurrenten.

Klassischerweise werden fungale Toxine in zwei Hauptgruppen unterteilt (Prell & Day, 2001): zum einen in wirtsspezifische Toxine (*host-specific* bzw. *host-selective toxins*), wovon nur wenige Beispiele bekannt sind und zum anderen in die wirtsunspezifische (*non-selective toxins*). Während es die wirtsspezifischen Toxine dem Pathogen ermöglichen, selektiv nur toxin-sensitive Wirtsarten bzw. Genotypen zu befallen und sich über charakteristische Erkennungsmechanismen die Nahrungsressource erschließen, wirkt die zweite Gruppe der Toxine unspezifisch u. a. auch auf Pflanzen, die nicht zum direkten Wirtsspektrum gehören.

Wirtsspezifische Toxine

Diese Phytotoxine werden u. a. von diversen fungalen Vertretern gebildet, wobei *Alternaria*- und *Cochliobolus*-Arten überwiegen. Es handelt sich hierbei um nieder- oder hochmolekulare Verbindungen aus verschiedensten chemischen Stoffklassen. Einen Überblick über ausgewählte Toxine und deren sehr spezifische Wirkmechanismen geben u. a. Walton (1996), Yoder et al. (1997), Markham & Hille (2001) oder Wolpert et al. (2002). Damit es zu einer Reaktion an der Pflanze kommen kann bzw. die Invasion des Pathogens mit darauf folgender Krankheitsausbildung erfolgreich abläuft, müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein (Prell & Day, 1996; Heiser, 2005):

- a) das Vorhandensein eines aktiven Rezeptors an einem toxinsensitiven Wirt für das durch ein entsprechendes toxinpositives Pathogen (Genotyp) sezerniertes Phytotoxin bzw.
- b) die toxinsensitive Wirtspflanze verfügt, beispielsweise aufgrund von genetischen Defekten, nicht über einen Entgiftungsmechanismus für das Toxin.

Wirtsspezifische Toxine

Die überwiegende Zahl der bekannten Phytotoxine gehört dieser zweiten Gruppe an. Auch hier sind die Wirkmechanismen vielfältig, wobei die Wirkbreite dieser Toxine charakteristisch ist. Grundlegend werden folgende Kategorien unterschieden (Elstner et al., 1994):

- a) Beeinflussung der Enzymaktivität, beispielsweise durch Hemmung der Chloroplasten-ATP-Synthase (Tentoxin - *Alternaria*-Arten; Ballio, 1991)
- b) Hormonartige Wirkung, z. B. Helminthosporol mit einer Gibberellin-artigen Wirkung (*Bipolaris sorokiniana* (SACC.) SHOEMAKER; Briggs, 1966)
- c) Beeinflussung des Wasserhaushaltes *via*
 - Beeinflussung der Membranpermeabilität (Bsp. Enniatin - *Fusarium*-Arten; Elstner et al., 1994) oder
 - Regulation der Stomata-Öffnung (Bsp. Fusicoccin - *Fusicococcum amygdali* DELACR; Ballio, 1991)
- d) Oxidation von Membranlipiden und Pigmenten durch Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Bsp. Cercosporin - *Cercospora*-Arten; Daub & Hangarter, 1983)

Die Folge dieser Prozesse sind u. a. Welkeerscheinungen, Chlorosen und Nekrosen, die zum Absterben der befallenen Pflanze oder einzelner Pflanzenteile führen können. Die nicht-wirtsspezifischen Toxine umfassen Verbindungen unterschiedlichster Strukturen, so z. B. Glykoside, Peptide, Aminosäurederivate, aromatische Verbindungen sowie Terpenoide und Polyketide. Aufgrund der völlig verschiedenen Strukturen spielen allgemein gültige Struktur-Wirkungsbeziehungen eine untergeordnete Rolle. Die Produzenten dieser Toxine sind meist „Schwächeparasiten“, welche die Wirtspflanzen zum Absterben bringen, um sie saprophytisch bzw. perithotroph als Nahrungsquelle zu nutzen (Rudolph, 1976; Mitchel, 1984; Desjardins & Hohn, 1997; Heiser et al., 1998).

1.4 Zielstellung

Um phytopathogene bzw. perthotrophe Pilze und die davon ausgehende Gefahr durch toxische Sekundärmetabolite abschätzen oder dagegen vorgehen zu können, müssen im Vorfeld genaue Kenntnisse darüber erlangt werden. Mangelhaftes Wissen über die von *R. collo-cygni* bzw. *R. uredinicola* sezernierten Sekundärmetabolite und ihre Bedeutung für die Gerstenkrankheit gab Anlass zu Untersuchungen auf diesem Gebiet.

Ziel dieser Arbeit war es somit,

- geeignete Kulturbedingungen für den phytopathogenen Pilz *R. collo-cygni* als den Erreger der RLSD sowie für den hyperparasitären Pilz *R. uredinicola* zu finden, um weiterführend Erkenntnisse über relevante Sekundärmetabolite zu erlangen, welche u. a. für die hervorgerufene Pflanzenkrankheit verantwortlich sind. Dazu sollte unter Verwendung klassischer Extraktions- und Trennmethoden (z. B. DC, HPLC) eine geeignete Isolierungsstrategie entwickelt werden.
- die Strukturen der isolierten Einzelverbindungen mit Hilfe unterschiedlicher spektroskopischer Methoden (MS, IR, UV/Vis, NMR) aufzuklären und diese physikochemisch zu charakterisieren.
- die *in vitro* isolierten Substanzen *in vivo* nachzuweisen, um einen Zusammenhang zur RLSD belegen zu können und gleichfalls die Wirkmechanismen der Verbindungen zu charakterisieren (wirtsspezifische oder nicht-wirtsspezifische Toxizität).
- durch Fütterung von Biosynthese-Präkursoren Informationen über den Biosyntheseweg der Verbindungen zu erhalten.
- in molekularbiologischen Versuchen zusätzlich Einblicke in die Biosyntheseenzyme zu erhalten.
- unterschiedliche *Ramularia*-Stämme und -Arten auf ihr Produktspektrum zu untersuchen.
- die isolierten Verbindungen auf antibiotische und antivirale Aktivität sowie in Proliferations- und Zytotoxizitätsassays zu testen, um Erkenntnisse über deren Wirkpotential zu erhalten.
- eine phylogenetische Einordnung bzw. Zuordnung verschiedener *Ramularia*-Arten hinsichtlich ihrer Rubellin-Produktion vorzunehmen.

2 Methoden und Material

2.1 Pilzkulturen

Die verwendeten *R. collo-cygni*-Stämme sowie *Ramularia*-Arten wurden von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Außenstelle Kleinmachnow (Dr. Edelgard Sachs) bezogen (Tabelle 2.1). Die Art *R. uredinicola* hingegen wurde von Prof. Dr. Uwe Braun (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Geobotanik & Botanischer Garten) zur Verfügung gestellt. Die vorliegenden Isolate sind in eigener Stammhaltung weiter kultiviert worden. Für die Untersuchungen zur Wachstums- und Bildungskinetik, sowie zu Biosynthese-Untersuchungen wurde das Isolat 43/3 (*R. collo-cygni*) verwendet.

Tabelle 2.1: Übersicht aller verwendeten *R. collo-cygni*-Stämme und *Ramularia*-Arten.

Art	Isolat	Datum	Herkunft	Wirt	Sorte
<i>R. collo-cygni</i>	38	15.06.99	Stadl-Paura (Oberösterreich/Österreich)	<i>Secale cereale</i>	
<i>R. collo-cygni</i>	43/3	10.06.99	Goumoens-la-Ville (Vaud/Schweiz)	<i>Hordeum vulgare</i>	
<i>R. collo-cygni</i>	55	01.07.99	Sibrina (Tschechien)	<i>Hordeum vulgare</i>	Sommergerste
<i>R. collo-cygni</i>	58	06.07.99	Aberdeen (Schottland)	<i>Hordeum vulgare</i>	"Juwel"
<i>R. collo-cygni</i>	79	14.01.00	Christ Church (Neuseeland)	<i>Hordeum vulgare</i>	
<i>R. collo-cygni</i>	86/1	16.02.00	Ahiaruhe/Wairarapa (Neuseeland)	<i>Hordeum vulgare</i>	"Fleet"
<i>R. collo-cygni</i>	86/3	16.02.00	Ahiaruhe/Wairarapa (Neuseeland)	<i>Hordeum vulgare</i>	"Cask"
<i>R. collo-cygni</i>	94/2	Juni 00	Bohemia (Tschechien)	<i>Hordeum vulgare</i>	"Luran"
<i>R. collo-cygni</i>	95/1	23.05.00	Marburg (Hessen/Deutschland)	<i>Hordeum vulgare</i>	"Duet"
<i>R. collo-cygni</i>	101	Nov. 00	Pla (Argentinien)	<i>Hordeum vulgare</i>	Sommergerste
<i>R. collo-cygni</i>	102	Nov. 00	Süd-Uruguay	<i>Hordeum vulgare</i>	Sommergerste
<i>R. collo-cygni</i>	103	07.02.01	Neuseeland	<i>Hordeum vulgare</i>	
<i>R. collo-cygni</i>	141	30.01.02	Church (Neuseeland)	<i>Hordeum vulgare</i>	Sommergerste
<i>R. collo-cygni</i>	197	22.07.02	Lambach (Oberösterreich/Österreich)	<i>Triticum aestivum</i>	Winterweizen
<i>R. collo-cygni</i>	198	22.07.02	Lambach (Oberösterreich/Österreich)	<i>Avena sativa</i>	
<i>R. collo-cygni</i>	200	Juli 02	Straubing (Bayern/Deutschland)	<i>Hordeum vulgare</i>	
<i>R. grevilleana</i>	208	22.05.03	Potsdam (Brandenburg/Deutschland)	<i>Fragaria vesca</i>	
<i>R. inaequalis</i>	90	Juni 00	Berlin-Dahlem (Deutschland)	<i>Taraxacum officinale</i>	
<i>R. pratensis</i>	89	Juni 00	Berlin-Dahlem (Deutschland)	<i>Rumex sp.</i>	
<i>R. rubella</i>	RR	22.02.07	Wanganui (Australien)	<i>Rumex acetosa</i>	
<i>R. uredinicola</i>	IRAN	03.07.04	Sumaehsara (Guilan/Iran)	<i>Melampsora sp.</i> (<i>Salix babylonica</i>)	

2.2 Kultivierung

Die Stammhaltung erfolgte auf V8-Agar-Platten (Tabelle 2.2) bei 4 °C. Für die weitere Verwendung wurde das Mycel zwei bis drei Wochen vor Gebrauch erneut auf frischen V8-Agar-Platten ausplattiert und bei 20 °C kultiviert. Zur Simulation eines künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus wurde ein zwölfstündiger Beleuchtungszyklus (1,5 - 2,0 W/m²) gewählt. Die submerse Vor- und Hauptkultur mit je 100 ml Nährlösung pro 500 ml-Kulturkolben wurden bei gleichen Temperatur- und Lichtverhältnissen auf einem Rundschüttler bei 135 rpm oder als Standkultur kultiviert. Alle verwendeten Materialien bzw. die auf den entsprechenden pH-Wert eingestellten Medien wurden bei 121 °C für 30 min autoklaviert. Zusätzliche Materialien wurden im Trockenschrank für 120 min bei 160 °C heißluftsterilisiert oder als sterile Einmalprodukte verwendet. Die Beimpfungen fanden unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Air-Flow-Box statt.

Tabelle 2.2: Kulturmedien für V8-Agar-Platten und V8-Flüssigmedium (verändert nach Atlas & Parks, 1993).

	V8-Agar-Platten	V8-Flüssigmedium
Gemüse-Saft (ALBI [®])	100 ml	200 ml
CaCO ₃	3 g	3 g
Agar-Agar	15 g	-
Saccharose	10 g	-
Penicillin G	100 mg	-
Streptomycinsulfat	50 mg	-
Chlortetracyclin	10 mg	-
Aqua dest.	<i>ad</i> 1000 ml	<i>ad</i> 1000 ml
pH-Wert	6,2	6,2

Die Vorkultur in V8-Flüssigmedium wurde jeweils mit sechs Stanzstücken (Ø = 10 mm) pro Kulturkolben beimpft und unter oben beschriebenen Lichtverhältnissen kultiviert. Für die Beimpfung von 48 Kolben Hauptkultur wurden 10 Kolben Vorkultur verwendet. Nach 7 Tagen wurde das Mycel der Vorkultur abzentrifugiert (6000 rpm), zweimal mit sterilem Aqua dest. gewaschen, in 300 ml Aqua dest. aufgenommen und anschließend mit einem Ultra-Turrax (9500 rpm) zerkleinert. Für die Hauptkultur wurden je 100 ml Czapek-Thom-Medium (Tabelle 2.3) mit 5 ml der gewonnenen homogenen Suspension (5 ml entsprechen 73 ± 7 mg Trockengewicht) pro Kolben beimpft und unter den oben genannten Bedingungen 14 bzw. 21 Tage (als Standkultur 35 Tage) kultiviert.

Tabelle 2.3: Hauptkulturmedium (verändert nach Dickscheit & Janke, 1967).

Czapek-Thom-Flüssigmedium	
Saccharose	10,0 g
MgSO ₄	0,5 g
KNO ₃	2,0 g
KCl	0,5 g
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	1,3 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01 g
Aqua dest.	<i>ad</i> 1000 ml
pH-Wert	5,8

Zur Optimierung der Ausbeute einiger Sekundärmetabolite wurde das Hauptkulturmedium (Tabelle 2.3) folgendermaßen modifiziert: Der Anteil des Aqua dest. sowie von Dikaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄ x 3 H₂O) wurden hierbei durch einen 66 mM Phosphatpuffer (nach Sörensen) vollständig ersetzt und damit das Kulturmedium auf einen pH-Wert von 5,4 abgepuffert.

2.3 Isolierungsmethoden

2.3.1 Extraktion

Das Mycel wurde über einen Büchner-Trichter (Filterpapier mittelhart) vom Kulturfiltrat getrennt, anschließend erschöpfend auf einem Magnetrührer (260 rpm) mit Ethylacetat (zweimaliger Wechsel des Extraktionsmittels) extrahiert und abschließend abfiltriert.

Um eine höhere Produktausbeute zu erhalten, wurde das Kulturfiltrat mit HCl auf pH 4,5 eingestellt. Anschließend wurde das Kulturfiltrat in Flüssig-Flüssig-Perforatoren (Abbildung 2.1) verschiedener Größen (300 - 1600 ml KF) kontinuierlich mit Ethylacetat erschöpfend (je nach Volumen 3 - 8 h) extrahiert. Um einen möglichen Siedeverzug zu verhindern wurde eine Siedeglocke im Rundkolben verwendet. Die Temperatur des Kühlwassers betrug 8 °C.

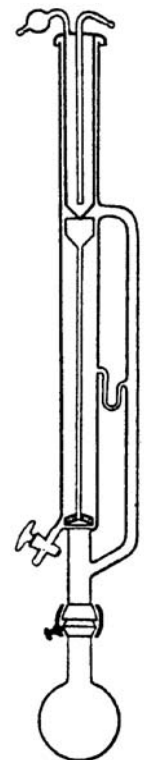


Abbildung 2.1: Flüssig-Flüssig-Perforator (Becker et al., 1993)

Um auch säurelabile Metabolite isolieren zu können, wurde ein zweites Verfahren zur Aufarbeitung des Kulturfiltrates entwickelt. Nach Lyophilisierung wurde hierbei mit Methanol unter zweimaligem Wechsel des Extraktionsmittels auf einem Magnetrührer (260 rpm) erschöpfend extrahiert und dann abfiltriert. Aus den erhaltenen Extraktlösungen wurde jeweils am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

2.3.2 Vorfraktionierung an Kieselgel

Zur Vorfraktionierung der Extrakte (aufgenommen im Laufmittel) erfolgte eine Normalphasen-Chromatographie an Kieselgel 60 (Glassäule, eigene Füllung) mit einem Laufmittelgemisch Ethylacetat/Methanol/Wasser (100:17:13). Die Detektion erfolgte visuell durch die Eigenfärbung der Verbindungsgemische. Nach erfolgter Fraktionierung wurden die Verbindungsgemische zur Trockne gebracht.

2.3.3 Präparative HPLC

Für die präparative HPLC wurden zwei Gerätesysteme der Firma SHIMADZU (HPLC-Anlage 1 und 2) verwendet, wobei nur die HPLC-Anlage 1 mit einem Dioden-Array-Detektor ausgerüstet war.

Zur Probenvorbereitung wurden die Fraktionen in Methanol/Acetonitril (4:1) aufgenommen und über einen Membranfilter (Spartan 30/0,45 µm) unlösliche Rückstände entfernt. Je nach Polarität der zu trennenden Fraktionen wurden verschiedene HPLC-Trennsysteme (Tabelle 2.4) entwickelt.

HPLC-System 1

Gewinnung:	Rubellin A, B, C, D, 14-Dehydrorubellin D, Uredinorubellin I und II, sowie Ure_4 und Ure_5
Säulensystem:	präparativ bzw. semipräparativ
Laufmittel:	LM D ₂ (isokratische Elution)

HPLC-System 2

Gewinnung:	Caeruleoramularin I und II
Säulensystem:	präparativ
Laufmittel:	LM D ₁ (isokratische Elution)

HPLC-System 3

Gewinnung: Chrysophanol, Helminthosporin

Säulensystem: präparativ

Laufmittel: LM D₅ (isokratische Elution)*HPLC-System 4*

Gewinnung: Rubellin E und F

Säulensystem: präparativ bzw. semipräparativ

Laufmittel: LM D₃ (Gradientenelution) und LM D₂ (isokratische Elution)

Tabelle 2.4: Säulen- und Trennparameter der präparativen und semipräparativen, inklusive analytischer HPLC (siehe 2.4.1), LM siehe Kapitel 2.11.3, Tabelle 2.8.

HPLC-Säulensysteme	Vorsäule	Trennsäule	Injektionsvolumen	Elutionsgeschwindigkeit	Laufmittel
präparativ	SecurityGuard PREP™ Phenomenex®	Luna 10µ Phenomenex®	2 ml	8,0 bzw. 6,5 ml/min	LM D ₁ LM D ₂ LM D ₃ LM D ₅
semipräparativ	SecurityGuard™ Phenomenex®	Luna 5µ Phenomenex®	2 ml	5,0 ml/min	LM D ₂
analytisch	SecurityGuard™ Phenomenex®	Luna 5µ Phenomenex®	20 µl	0,6 ml/min	LM D ₁ LM D ₂ LM D ₄

2.3.4 Sephadex® LH-20

Zur weiteren Aufreinigung der *via* Kieselgel und HPLC vorgereinigten Verbindungen erfolgte eine Größenausschlusschromatographie an Sephadex® LH-20 (Partikelgröße 25 - 100 µm). Für diese Gelfiltration wurden selbstgefüllte Glassäulen verwendet (Tabelle 2.5), wobei die Detektion ebenfalls visuell bzw. spektroskopisch bei 510 nm erfolgte. Nach vorheriger Konditionierung der Säulen erfolgte das Auftragen der im jeweiligen Laufmittel gelösten Probe. Das Eluat wurde mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen.

Tabelle 2.5: Säulenparameter der analytischen und präparativen Gelfiltration

	analytische Säule	präparative Säule
Säulengröße	Ø = 1,60 cm, h = 90 cm	Ø = 2,60 cm, h = 90 cm
Flussrate	0,3 ml/min	1,5 ml/min

Lagen die isolierten Verbindungen nach erfolgten Aufarbeitungsschritten (Kieselgel 60, präparative HPLC und Sephadex[®] LH-20) noch nicht in ausreichend reiner Form vor, erfolgten rechromatographische Trennschritte mit den entsprechenden Säulen und Laufmittelgemischen (HPLC-Systeme).

2.4 Analytische Methoden

Zur Analyse, Charakterisierung und Identitätsprüfung der isolierten Verbindungen wurden chromatographische (Dünnschicht- und Hochleistungsflüssigchromatographie) und spektroskopische Methoden (UV/Vis-, Infrarot-, Kernresonanz- und Massenspektroskopie, sowie Polarimetrie) verwendet.

2.4.1 Chromatographie

Analytische HPLC

Die analytische HPLC erfolgte an HPLC-Anlage 1. Vor der manuellen Injektion erfolgte eine nochmalige Filtration der Probe (Membranfilter: Spartan 3/0,45 µm). Als stationäre Phase wurde eine Umkehrphase (Tabelle 2.4) verwendet (Säulentemperatur 25 °C). Die mobile Phase bestand aus einem Gemisch von Methanol/Acetonitril (4:1) und Reinstwasser, wobei bei den Laufmitteln LM D₁ und LM D₄ zur Verbesserung der Trennleistung HCOOH zugefügt wurde (siehe 2.11.3, Tabelle 2.8). Als Referenzsubstanzen wurden Standards benutzt, die auf präparativem Wege in entsprechender Reinheit gewonnen wurden. Die Substanzerkennung erfolgte mit Hilfe eines Dioden-Array-Detektors anhand der charakteristischen Absorptionsspektren bzw. der jeweiligen Absorptionsmaxima.

Für die quantitative Analyse von Extrakten oder Reinsubstanzen wurden unter Verwendung von Verdünnungsreihen (5, 10, 20, 40, 50 und 100 µg/ml; hergestellt aus 200 µg/ml) Kalibriergeraden erstellt. Die Messungen wurden pro Konzentration dreifach wiederholt.

Dünnschichtchromatographie

Die analytische Dünnschichtchromatographie (DC) wurde auf verschiedenen DC-Platten mit unterschiedlichen Laufmitteln durchgeführt, wobei sich die in Tabelle 2.6 aufgelisteten Kombinationen als optimal herausstellten. Der Substanzauflauf (Startlinie 1 cm) erfolgte bei normaler Luftfeuchtigkeit unter Zuhilfenahme eines Heißlufttrockners. Die Chromatogramme wurden in entsprechenden DC-Kammern mit Kammersättigung entwickelt. Als Vergleichssubstanzen wurden Standards benutzt, die auf präparativem Wege in entsprechender Reinheit

gewonnen wurden. Die Detektion der Banden erfolgte wenn möglich aufgrund der Eigenfärbung bei Tageslicht oder mit Hilfe einer DC-UV-Dokumentation bei 254 bzw. 366 nm.

Zum dünnschichtchromatographischen Nachweis von Fettsäuren wurden Proben auf RP-18-Platten (LM: Eisessig/H₂O (19:1) nachträglich mit Sprühreagenz (10 % Molybdato-phosphorsäure (50 %ige ethanolische Lösung); 10 min bei 110 °C) entwickelt.

Tabelle 2.6: Verwendete DC-Phasen (LM siehe Kapitel 2.11.3, Tabelle 2.8).

Stationäre Phase	Hersteller	Schichtdicke	Laufmittel
DC-Aluminiumfolien Kieselgel 60	Merck	0,20 mm	LM A ₁ , A ₂
DC-Aluminiumfolien Kieselgel 60 F ₂₅₄	Merck	0,20 mm	LM A ₁ , A ₂
Kieselgel 60 ADAMANT (auf Glas)	Macherey-Nagel	0,25 mm	LM A ₁ , A ₂
DC-Aluminiumfolien RP-18 F ₂₅₄ S	Merck	0,16 - 0,20 mm	LM B ₁ , B ₂

2.4.2 Spektroskopie

UV/Vis-Spektroskopie

Die molaren Extinktionskoeffizienten ϵ der isolierten Reinsubstanzen wurden bei den jeweiligen Absorptionsmaxima mittels eines UV/Vis-Spektrophotometers (Wellenlängenbereich 190 - 800 nm) unter Verwendung einer Quarzküvette bestimmt. Hierbei wurden fünf Verdünnungen pro Substanz ausgehend von einer Stammlösung der Konzentration 200 µg/ml in Methanol hergestellt und vermessen. Die Substanzeinwaage zur Herstellung der Stammlösung betrug mindestens 5,0 mg.

IR-Spektroskopie

Zur Aufnahme von IR-Spektren wurden KBr-Presslinge der Hauptverbindungen im Messbereich von 400 - 4000 cm⁻¹ mit einem Nicolet Avatar 370 DT GS IR-Spektrometer vermessen. Die Spektren wurden unter Basislinienkorrektur erstellt. Zur Analyse von Verbindungen, welche nur in geringen Mengen zur Verfügung standen, wurde ein IR-Spektrometer der Firma BIO-RAD (FTS-25) mit ATR-Küvette im Messbereich von 600 - 4000 cm⁻¹ verwendet.

Polarimetrie

Zur Messung der optischen Drehung wurden Konzentrationen von 0,1; 0,2 und 1,0 mg/ml der jeweiligen Verbindungen in Methanol hergestellt. Die Proben wurden in einem Polarimeter bei 20 °C und $\lambda = 589 \text{ nm}$ vermessen (Küvettenlänge 10 cm). Die erhaltenen spezifischen Drehwinkel geben somit an, um wie viel Grad die Polarisationssebene des Lichtes mit einer Wellenlänge von 589 nm durch eine methanolische Lösung angegebener Konzentration in einem 10 cm langen Polarisationsrohr gedreht wird. Die Nullwertbestimmung erfolgte gegen reines Methanol.

Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der molaren Massen mit der *Peak-Matching*-Methode wurden HR-ESI-Spektren (mit negativer Ionisation) an einem TSQ Quantum AM Massenspektrometer aufgenommen. Zur Probenvorbereitung wurden die Substanzen in Methanol/Wasser (99:1) gelöst und jeweils mit bzw. ohne Zusatz von Ammoniumacetat vermessen. Die Temperatur der Ionenquelle betrug 65 °C.

NMR-Spektroskopie

^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren wurden mit einem NMR-Spektrometer Bruker AVANCE 400, gekoppelt mit einer ASPEKT-Station (Software Bruker TOPSPIN) bei verschiedenen Temperaturen (25, 30 bzw. 65 °C) aufgenommen. Für die Messung wurden die Proben in deuterierten Lösungsmitteln aufgenommen und in verschließbare NMR-Röhrchen ($\varnothing = 5 \text{ mm}$) überführt. Die chemische Verschiebung δ wird in ppm angegeben.

Zur detaillierten Strukturaufklärung wurden in dieser Arbeit sowohl eindimensionale (^1H -, ^{13}C -, DEPT 90- und DEPT 135-Spektroskopie) als auch zweidimensionale NMR-Methoden, die zum einen auf homonuklearen (COSY-dqf, TOCSY, NOESY) als auch heteronuklearen Spin-Kopplungssystemen (HMBC, HSQC) beruhen, angewendet:

DEPT 90/DEPT 135 (distortionless enhancement by polarization transfer)

Hierbei handelt es sich um eine Sonderform der eindimensionalen ^{13}C -Spektroskopie, mit deren Hilfe die funktionellen Gruppen CH , CH_2 bzw. CH_3 unterschieden werden können. Dabei besitzen die Signale der CH_2 -Gruppen eine negative Amplitude.

HSQC (heteronuclear single quantum correlation)

Aufgenommene HSQC-Spektren ermöglichen die Zuordnung von Protonen zu den direkt gebundenen Kohlenstoffatomen.

HMBC (heteronuclear multiple bond correlation)

In HMBC-Spektren sind ^{13}C - ^1H -Kopplungen über mehrere Bindungen (2, 3 bzw. 4) detektierbar. Eine Einordnung quartärerer in die Nachbarschaft von nichtquarternären Kohlenstoffatomen wird mit diesem Verfahren möglich.

COSY-dqf (correlated spectroscopy with double quantum filter)

Bei dieser zweidimensionalen Protonen-Korrelation können Kopplungen zwischen H-Atomen über mehrere (2, 3, bei Allylkopplung bis 4) Bindungen erfasst werden.

TOCSY (total correlation spectroscopy)

Diese Methodik macht ^1H - ^1H -Kopplungen über mehrere kopplungsfähige Bindungen sichtbar, wobei im Unterschied zu COSY-Spektren, zusätzlich Korrelationen zwischen sämtlichen indirekt über mehrere Kopplungen eines Spinsystems verbundenen Kernen, detektiert werden können. Um genauere Aussagen über die räumliche Struktur zu erhalten, wurden weiterführend selektive TOCSY-Spektren erzeugt. Hierbei wird ein Proton selektiv angeregt und die Signale der über mehrere Bindungen koppelnden Protonen werden erfasst. Dieses Verfahren wird vor allem bei der Strukturaufklärung hochmolekularer Substanzen mit räumlich begrenzten Spinsystemen (z. B. Polysacchariden oder Peptiden) eingesetzt.

NOESY (nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy)

Über die Aufnahme von NOESY-Spektren konnten Kopplungen, die auf der räumlichen Nähe der beteiligten Protonen beruhen, detektiert werden.

2.5 Wachstums- und Bildungskinetik bei *R. collo-cygni*

Für die Erstellung einer Wachstums- bzw. Bildungskinetik wurde der Referenzstamm 43/3 verwendet. Der Stamm wurde wie in Kapitel 2.2 beschrieben kultiviert, jedoch mit Änderung der Kohlenstoffquelle: Saccharose wurde durch Glucose ersetzt, die einfacher zu quantifizieren war, aber in vergleichbarer Weise metabolisiert wird. In dreitägigem Rhythmus erfolgte die Probenentnahme. Hierbei wurden drei Kolben der Fermentation entnommen und deren Inhalt vereinigt, um mögliche Schwankungen pro Kulturkolben ausschließen zu können. Das ermittelte Ergebnis wurde dann rechnerisch auf einen Kulturkolben bezogen.

Nach Trennung von Kulturfiltrat und Mycel über einen Büchner-Trichter wurden die Kulturparameter Mycelfrischgewicht und pH-Wert des Kulturfiltrates registriert. Weiterhin wurden 5 ml Kulturfiltrat zur Bestimmung der Glucosekonzentration entnommen. Das Mycel wurde unter Rühren (240 rpm) erschöpfend mit Ethylacetat extrahiert. Um die Produktausbeute des Kulturfiltrates zu erhöhen, wurde es mit 3 N Salzsäure auf einen pH-Wert von 4,0 eingestellt und in einem Perforator erschöpfend (7 - 9 h) extrahiert. Die Extrakte wurden am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt.

Die Rückstände aus Mycel- und Kulturfiltratextrakten wurden in Methanol/Acetonitril (4:1) aufgenommen und in geeigneten Verdünnungen an der HPLC-Anlage 1 analytisch vermessen (LM D₂ bzw. LM D₄; Tabelle 2.4). Für die quantitative Analyse relevanter Sekundärmetabolite wurden Kalibriergeraden (siehe 2.4.1) erstellt.

2.6 Stämme- und Artenvergleich

Es wurden 16 verschiedene Stämme von *R. collo-cygni* sowie die *Ramularia*-Arten *R. uredinicola*, *R. rubella* (BONORD.) NANNF., *R. inaequalis* (PREUSS) U. BRAUN, *R. grevilleana* (OUDEM.) JØRST und *R. pratensis* SACC. auf ihr Toxinspektrum bzw. die Fähigkeit zur Rubellin-Bildung untersucht. Die jeweilige Kultivierung (21 Tage) erfolgte wie in Kapitel 2.2 beschrieben. Zur Quantifizierung der Verbindungen wurden pro Ansatz drei Kolben entsprechend in Kulturfiltrat und Mycel getrennt und erschöpfend mit Ethylacetat extrahiert. Der zur Trockne gebrachte Rückstand wurde weiterführend in einer definierten Menge Methanol aufgenommen und mittels DC (DC-Aluminiumfolien RP-18 F₂₅₄ S LM B₁; siehe Kapitel 2.4.1) und HPLC (siehe Kapitel 2.4.1; LM D₂) analysiert. Über zuvor erstellte Kalibriergeraden wurden die Konzentrationen der Hauptverbindungen ermittelt. Des Weiteren wurden das Mycelfrischgewicht und der pH-Wert bestimmt.

2.7 Molekularbiologische Arbeiten

Die hier vorgestellten molekularbiologischen Arbeiten und die Sequenzauswertung sowie Berechnungen der Phylogenien wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Harald Kellner (University of Michigan, USA) durchgeführt. Standardprotokolle wurden nach den Anleitungen von Sambrook & Russell (2001), sowie die molekularbiologischen Reagenzienkits entsprechend der mitgelieferten Hersteller-Protokolle verwendet.

Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung der fungalen ITS-Region

Die ITS-Region (*internal transcribed spacer*) ist ein nicht-kodierender Bestandteil des DNA-Abschnitts, welcher für den Aufbau der ribosomalen RNA verantwortlich ist. Sie wird von zwei Genen für ribosomale Untereinheiten (18S rRNA-Gen und 28S rRNA-Gen) flankiert (Abbildung 2.2). Die rRNA-Gene und Spacerregionen liegen in multiplen (fast immer) identischen Kopien vor, wodurch sie relativ gut zu amplifizieren sind (White et al., 1990). Die ITS-Region setzt sich aus den beiden Abschnitten ITS1 und ITS2, welche zusammen das 5,8S-rRNA-Gen einschließen, zusammen. Die flankierenden Bereiche der ITS-Region sind hoch konserviert und ermöglichen somit die Amplifikation der ITS-Region vieler Pilze und anderer Eukaryoten mit analogen Primern (White et al., 1990). Die ITS-Region ist jedoch als nicht-kodierende Sequenz (ITS1 und ITS2) selbst variabel genug, um innerhalb der untersuchten Gruppe phylogenetische Unterschiede aufdecken zu können (Buscot et al., 2000).

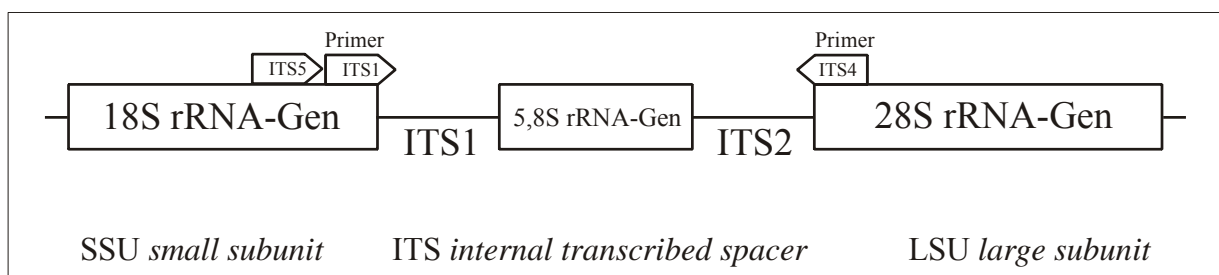


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der ITS-Region (inkl. verwendeter Primer).

Um mögliche verwandtschaftliche Beziehungen zwischen Rubellin-produzierenden *Ramularia*-Arten und nichtproduzierenden Arten (z. B. viele *Mycosphaerella*-Arten, alias Teleomorphen von *Ramularia*) zu erkennen, wurden von ausgewählten *Ramularia*-Stämmen und -Arten (Stamm-Nr. 38, 43/3, 55, 58, 86/1, 89, 90, 101, 102, 200, 208, RR und IRAN, siehe Tabelle 2.1) die jeweiligen ITS-Regionen aus genomischer DNA amplifiziert und nach Klonierung in *E. coli* sequenziert.

Dazu wurde das Pilzmaterial in einem Mikroreaktionsgefäß mittels Pistill und der Zugabe von flüssigem Stickstoff zerkleinert und anschließend die genomische DNA mit dem *DNeasy Plant Mini Kit* extrahiert. Die Amplifizierung mittels PCR erfolgte mit einem Thermocycler unter Verwendung des folgenden Programms: nach Initialdenaturierung (3 min bei 94 °C) folgten 35 Zyklen (60 s bei 94 °C, 30 s bei 50 °C und 80 s bei 72 °C) bis zur abschließenden Elongationsphase (10 min bei 72 °C). Der PCR-Ansatz für ein Gesamtvolumen von 50 µl bestand aus 1 U *Taq*-DNA-Polymerase, 5 µl 10fach *Taq*-Polymerase-Reaktionspuffer, 10 nmol dNTP-Mix, 50 pmol Primer (ITS1 oder ITS5 und ITS4), sowie 1 µl genomischer DNA. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht kontrolliert. Die jeweiligen PCR-Produkte wurden weiterhin in einen pCR4-Topo Vector kloniert und in chemisch kompetente *E. coli* (TOP10) transformiert. Die Plasmide wurden mittels *Perfectprep Plasmid Mini Kit* extrahiert. Die Sequenzierung erfolgte mit einem DNA-Kapillarsequencer unter Verwendung eines Sequenzierungskits in beide Richtungen mit den Primern M13-Forward und M13-Reverse (siehe Kapitel 2.11.5).

Für den phylogenetischen Vergleich der hier gewonnenen ITS-Sequenzen wurden weitere Sequenzen aus der NCBI-Datenbank (National Center of Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nach einer BLAST-Suche hinzugezogen (siehe Anhang Tabelle A.19).

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm BioEdit, Version 7.0.8 (Hall, 1999) aliniert und visuell korrigiert. Nachfolgende phylogenetische Analysen wurden mit dem Programm PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003) durchgeführt. In dieser Arbeit kamen die beiden Standardmethoden *Maximum Parsimony* sowie das Distanzverfahren zum Einsatz (Wägele, 2001). Die Datengrundlage für beide Verfahren bildete eine Alinierung der ITS-Region über 504 Nukleotidpositionen. Die Berechnung des *Strict-Consensus*-Dendrogramms nach der *Maximum-Parsimony*-Methode erfolgte aus den 1074 sparsamsten Bäumen (Optionen: heuristische Suche, *simple sequence addition*, *tbr branch swapping*). Zur Erstellung eines *Neighbor-Joining*-Dendrogramms (Saitou & Nei, 1987) der *Ramularia*-Gruppe (inkl. 41 systematisch verwandter Taxa) wurde das Distanzverfahren K2P nach Kimura (1980) verwendet. Das Dendrogramm wurde durch 2000 *Bootstrap*-Replikate (Felsenstein, 1985; Huelsenbeck et al., 1996) verifiziert, die Werte über den jeweiligen Ästen geben die prozentuale Häufigkeit in den Replikaten an.

Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung der Typ-I-Polyketid-Synthase-Gene

Die genomische DNA wurde jeweils aus *R. collo-cygni* (43/3) und *R. uredinicola* extrahiert (siehe oben) und PCR-Amplifizierungsversuche mit folgenden degenerierten Primern in einem PCR-Thermocycler durchgeführt: KAF1/KAR1, KAF2/KAR1, KAF1/KAR2 und KAF2/KAR2 (Amnuaykanjanasin et al., 2005). Für einen 50 µl PCR-Ansatz wurden folgende Reagenzien und PCR-Programme verwendet:

0,5 µl Triple Master Mix, 2 mM dNTP, 5 µl High Fidelity Puffer (mit 25 mM MgOAc), Primer-Mix (KAF1/KAR1, KAF2/KAR1, KAF1/KAR2 und KAF2/KAR2: 0,5 µM pro Primer und Ansatz), sowie 1 µl genomische DNA. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung des folgenden PCR-Programms (Amnuaykanjanasin et al., 2005): Nach Initialdenaturierung (5 min bei 95 °C) folgten 35 Zyklen (30 s bei 94 °C, 60 s bei 48 °C und 120 s bei 72 °C) bis zur abschließenden Elongationsphase (7 min bei 72 °C).

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht kontrolliert. Die jeweiligen PCR-Produkte wurden weiterhin in einen pCR4-Topo Vector kloniert und in chemisch kompetente *E. coli* (TOP10) transformiert. Die Plasmide wurden mittels *Perfectprep Plasmid Mini Kit* extrahiert. Die Sequenzierung erfolgte mit einem DNA-Kapillarsequenzier unter Verwendung eines Sequenzierungskits in beide Richtungen mit den Primern M13-Forward und M13-Reverse.

Die erhaltenen Sequenzen wurden zuerst mit der NCBI-Datenbank verglichen (BLASTx-Suche) und anschließend in Bioedit 7.0.8 weiterbearbeitet. Die Nukleotid-Sequenzen wurden im Anschluss auf eventuelle Introns untersucht. Wahrscheinliche Introns wurden markiert und herausgeschnitten, resultieren in der Exonsequenz, die anschließend in die Aminosäuresequenz übersetzt wurde. Die resultierende AS-Sequenz wurde für die Phylogenieberechnung genutzt. Es wurden dazu weitere AS-Sequenzen aus der NCBI-Datenbank hinzugezogen; hauptsächlich die von Amnuaykanjanasin et al. (2005) benutzten Sequenzen. Die Phylogenie wurde mit MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007) mit folgenden Parametern berechnet: *neighbor-joining*, *poisson correction* und *uniform rates*. Zur statistischen Absicherung wurde eine *Bootstrap*-Analyse mit 2000 Replikaten durchgeführt. Der phylogenetische Baum wurde mit Corel Draw 12 editiert und die Einordnung der *clades* (reduzierende und nichtreduzierende PKS) erfolgte nach Kroken et al. (2003) und Amnuaykanjanasin et al. (2005).

2.8 Rubellin-Nachweis *in vivo*

Pflanzenmaterial aus Deutschland, Österreich, Norwegen und Tschechien (Tabelle 2.7) mit typischer Krankheitssymptomatik (*Ramularia*-Blattflecken-Krankheit) wurde, wie bei Tschöpe & Sachs (2001) beschrieben, auf saurem Wasseragar (pH 4) ausgelegt, nach einer dreitägigen Inkubation entnommen, grob zerkleinert und zweimal mit Ethylacetat unter Rühren erschöpfend insgesamt 24 h extrahiert. Lediglich die Proben 5 und 8 wiesen eine native rötliche Färbung um die Chlorosen bzw. Nekrosen auf und wurden ohne vorheriges Inkubieren auf Saueragar extrahiert. Die organische Phase wurde abgetrennt, zur Trockne gebracht und der Rückstand in Methanol/Wasser (9:1) aufgenommen. Um hydrophilere Verbindungen, wie z. B. Chlorophylle und Xantophylle abzutrennen, wurde eine fraktionierte Gruppentrennung über eine konditionierte Baker-Säule (6 ml LiChroprep[®], LM B₂) durchgeführt. Zur Detektion und Quantifizierung der Hauptverbindungen wurde HPLC-Anlage 1 (siehe Kapitel 2.4.1; LM D₂) verwendet.

Tabelle 2.7: Herkunft des untersuchten Pflanzenmaterials

Nr.	Herkunft	Datum	leg.	Wirt	Sorte
1	Wetze, Niedersachsen	Juni 2002	Dr. J. Großer	<i>Hordeum vulgare</i>	Wintergerste "Aquarelle"
2	Marchtrenk, Oberösterreich	Juni 2002	Dr. H. Bistrich	<i>Hordeum vulgare</i>	Wintergerste
3	Loitersdorf, Bayern	Juni 2003	Dr. E. Sachs	<i>Hordeum vulgare</i>	Wintergerste "Camera"
4	Wehen, Niedersachsen	Juni 2003	Dr. E. Sachs	<i>Hordeum vulgare</i>	Wintergerste "Lomerit"
5	Uffenheim, Bayern*	Juli 2002	Dr. H. Bistrich	<i>Hordeum vulgare</i>	Wintergerste
6	Linden, Oberösterreich	August 2004	Dr. H. Huss	<i>Triticum aestivum</i>	
7	Schwanenstadt, Oberösterreich	August 2004	Dr. H. Huss	<i>Agropyron repens</i>	
8	Lambach, Oberösterreich*	März 2005	Dr. H. Huss	<i>Hordeum vulgare</i>	Wintergerste
9	Lambach, Oberösterreich	Juli 2005	Dr. H. Huss	<i>Avena sativa</i>	
10	Stjordal, Norwegen	August 2002	Dr. S. Salamati	<i>Hordeum vulgare</i>	Wintergerste
11	Luzany, Tschechien	August 2002	Dr. L. Stemberkova	<i>Hordeum vulgare</i>	Wintergerste

*Pflanzenmaterial mit nativen roten Flecken

2.9 Untersuchungen zur Biosynthese

Für die Biosynthese-Experimente der Rubelline wurde der Stamm 43/3 (*R. collo-cygni*) verwendet. Zur Optimierung der Produktausbeute von Rubellin B erfolgte die Kultivierung in Phosphat-gepuffertem Medium (siehe Kapitel 2.2).

¹⁴C-Präcursor

Zur Voruntersuchung auf eine Eignung von Acetat als Präcursor für die Biosynthese relevanter Metabolite, wurde ein ¹⁴C-Isotop gewählt (CH₃¹⁴COONa). Es wurden hierfür zwei Versuchsansätze mit unterschiedlichen Fütterungszeitpunkten (0. und 9. Kulturtag der Hauptkultur) zur Ermittlung des optimalen Isotop-Einbaus gewählt. Die Kultivierung erfolgte wie in Kapitel 2.2 beschrieben. Pro Ansatz sind drei Kulturkolben mit je 12,4 mg [1-¹⁴C]-markierten Natriumacetats (spezifische RA_{NaAc} = 4,0 x 10⁶ Bq/mmol) insgesamt 16 Tage in Kultur gehalten worden. Nach erfolgter Ernte der sechs Kulturkolben wurden die beiden Hauptverbindungen (Rubellin B und D) mittels erschöpfender Ethylacetat-Extraktion und anschließender präparativer HPLC (siehe 2.3.3; LM D₂) gewonnen. Die abschließende Radioaktivitätsmessung erfolgte an einem *Liquid-Scintillation*-Analyzer als Dreifachbestimmung von zwei Konzentrationen beider Hauptverbindungen (100 µl bzw. 50 µl/Messansatz) jeweils in 5 ml Szintillatorlösung.

¹³C-Präcursor

Zur weiteren detaillierten Aufklärung des Biosyntheseweges der Rubelline wurden in separaten Kultivierungen [1-¹³C]- und [2-¹³C]-Natriumacetat bzw. [U-¹³C₆]-D-Glucose als Präcursor eingesetzt.

Versuchsansätze:

- a.) 2 g [1-¹³C]-Natriumacetat pro 10 Kulturkolben bzw.
- b.) 2 g [2-¹³C]- Natriumacetat pro 10 Kulturkolben und
- c.) 1 g [U-¹³C₆]-D-Glucose verdünnt mit unmarkierter Glucose auf zusammen 25 g pro 25 Kulturkolben à 100 ml Medium.

Nach Isolierung und Aufreinigung der beiden Hauptverbindungen Rubellin B und D (siehe Kapitel 2.3.3; LM D₂) wurden die Proben jeweils in deuteriertem Tetrahydrofuran aufgenommen und in der NMR-Anlage AVANCE 400 vermessen und wie folgt beschrieben ausgewertet.

NMR-Auswertung der ^{13}C -Markierungsversuche

Zunächst erfolgte die Integration aller Werte (Software Topspin, Bruker). Da die so erhaltenen Flächen bekanntermaßen im unmarkierten Zustand (^{13}C -Gehalt 1,1 %) Unterschiede zeigen, wurde ein so genannter Response-Faktor (RF) berechnet. Er wird als Verhältnis der Flächen von einem Referenzkohlenstoff zu jedem Kohlenstoff des Moleküls errechnet, wobei der Referenzkohlenstoff den RF-Wert = 1,0 aufweist.

Der prozentuale relative Einbau an ^{13}C -Kohlenstoff in das Molekül für jeden Kohlenstoff wurde folgendermaßen bestimmt: aufgrund der Tatsache, dass ^{13}C -Atome mit einer C-H-Gruppierung beiderseits der Hauptresonanz des gebundenen Protons so genannte „Satelliten“ im ^1H -Spektrum verursachen, ist es möglich, über den Anteil der Flächen beider Satelliten an der Gesamtfläche des Protons den prozentualen ^{13}C -Einbau für dieses Kohlenstoffatom im Molekül zu ermitteln (Abbildung 2.3). Aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit von ^{13}C -Isotopen treten diese Signale in markierten Substanzen deutlicher in Erscheinung und können somit zur Berechnung herangezogen werden. Voraussetzung dafür ist ein isoliert stehendes ^1H -Hauptresonanzsignal einer ^{13}C -H-Gruppe (mit dazugehörigen Protonen) im ^1H -Spektrum. Für die Berechnung des prozentualen Anteils an ^{13}C -Kernen für alle Kohlenstoffatome wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{A_{\text{Ref.}} [\text{ppm}]}{{}^{13}\text{C}_{\text{Satellit}} [\%]} = \frac{A_{\text{m C}} \times \text{RF}}{X {}^{13}\text{C}_{\text{g C}} [\%]}$$

$${}^{13}\text{C}_{\text{Satellit}} [\%] = \frac{\text{NP}_1 + \text{NP}_2}{\text{NP}_1 + \text{NP}_2 + \text{HP}}$$

$A_{\text{Ref.}}$ = Fläche des Referenzkohlenstoffs im ^{13}C -Spektrum

$A_{\text{m C}}$ = Fläche des zu bestimmenden Kohlenstoffs im ^{13}C -Spektrum

${}^{13}\text{C}_{\text{Satellit}}$ = prozentualer Anteil des ^{13}C im Referenzkohlenstoff

$X {}^{13}\text{C}_{\text{g C}}$ = prozentualer Anteil des ^{13}C im gesuchten Kohlenstoff

RF = Response-Faktor

HP = Hauptresonanz

NP = Nebenresonanz (Satellit)

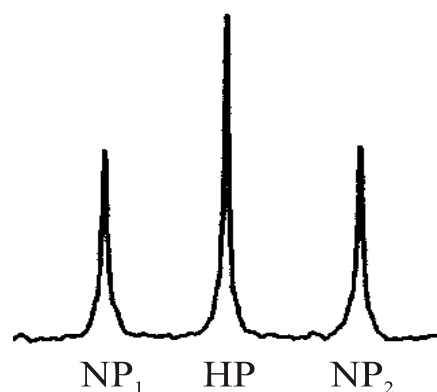


Abbildung 2.3: Resonanz eines Protons an einem ^{13}C -markierten Kohlenstoff mit sichtbaren Satelliten.

2.10 Biologische Aktivität

Die Untersuchung der biologischen Wirksamkeit der isolierten Verbindungen erfolgte in verschiedenen Kooperationen: mit der TU München-Weihenstephan durch Dr. I. Heiser (photodynamische Aktivität), mit der BBA Kleinmachnow durch Frau Dr. E. Sachs (Bioassays an Gersten-Pflanzen), Dr. U. Möllmann (HKI Jena, antibakterielle Wirkung), Dr. H.-M. Dahse (HKI Jena, K562-, Huvec-, HeLa-Zelllinienexperimente), Dr. M. Pickhardt (MPI Hamburg, Tau-Aggregation), Dr. M. Chrysai-Tokousbalides (Agricultural University Athens, antimykotische Wirkung), Dr. M. Gareis (BfEL Kulmbach, SK-Zellen), Dr. S. Gräfe und Dr. B. Gitter (Biolitec AG, HIG-82-, HT29-, J774A.1-Zellassays und Test an kommerziellen Bakterienstämmen), Dr. M. Schmidtke (FSU Jena, Antivirale Wirkung) und Dr. F. Gaube (FSU Jena, MCF-7-Experimente).

2.10.1 Bioassay an *Hordeum vulgare* L.

Für den Bioassay an der Wirtspflanze von *R. collo-cygni* wurden Blattstücke des zweiten Blattes mit einer Länge von 25 mm entnommen und in lichtdurchlässigen Polystyrol-Schalen mit der Blattunterseite auf Benzimidazol-Agar (15 g Agar-Agar *ad* 1 l Aqua dest., supplementiert mit 30 ppm Benzimidazol zur Frischhaltung) aufgelegt (Abbildung 2.4).

Mit einem Skalpell wurden den Blattsegmenten jeweils zwei 10 mm lange Verletzungen quer zur Blattader zugefügt. Pro Verletzung wurden 10 µl Testsubstanz verschiedener Konzentrationen (in Tropfenform) aufgebracht. Die Inkubation erfolgte bei 1,5 W/m² Permanentlicht und 18 °C. Der aufgebrachte Testtropfen wurde nach einer zweitägigen Einwirkzeit abgesaugt. Nach sechs Tagen wurden die nekrotischen Blattflächen prozentual zur Gesamtsegmentfläche bonitiert.



Abbildung 2.4: Testanordnung für den Bioassay an Blättern von *H. vulgare* (Foto: E. Sachs).

2.10.2 Photodynamische Aktivität

Zur Untersuchung der photodynamischen Aktivität der isolierten Substanzen wurde zum einen die toxininduzierte, lichtabhängige Fettsäureperoxidation von α -Linolensäure, untersucht (Grosch & Laskawy, 1979). In Anwesenheit von Übergangsmetallionen (Cu^{2+} , Fe^{2+}) können entstehende Linolensäure-Hydroperoxide (LOOH) zum Alkoxyradikal ($\text{LO}\cdot$) abgebaut werden, welches schließlich unter Bildung von Ethan und einem Aldehyd zerfällt.

Andererseits wurde die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies über die Spaltung von KMB (α -Keto-4-thiolmethylbuttersäure), einem Transaminierungsprodukt der Aminosäure Methionin erfasst. Dabei wird unter anderem Ethylen freigesetzt, welches gaschromatographisch detektiert werden kann (Elstner et al., 1978; Heiser et al., 2003). Die Menge an gebildetem Ethylen ist direkt proportional der Menge an generierten ROS (Krüedener et al., 1995).

Die folgenden Tests wurden sowohl unter Lichteinfluss als auch unter Lichtausschluss durchgeführt.

KMB-Spaltung

Die Reaktionsansätze enthielten 1,25 mM KMB, jeweils 46,5 μM Testsubstanz sowie 0,1 mM Phosphat-Puffer pH 5,0 in einem Endvolumen von 2 ml. Nachdem die luftdicht verschlossenen Ansätze 30 min bei 30 °C unter Lichteinfluss (500 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) bzw. im Dunkeln inkubiert worden waren, wurde 1 ml Gas zur Quantifizierung des entstandenen Ethylens mit einer luftdichten Spritze entnommen und gaschromatographisch mit einer Aluminiumoxid-Säule (1/8 inch x 100 cm, Säulentemperatur 60 °C, Injektortemperatur 80 °C) und einem Flammenionisationsdetektor (FID-Temperatur 225 °C) analysiert.

Fettsäureperoxidation

Die Reaktionsansätze enthielten 3,55 mM α -Linolensäure, jeweils 23, 46 bzw. 92 μM Testsubstanz sowie 0,1 mM Phosphat-Puffer (pH 5,0) in einem Endvolumen von 2 ml. Nachdem die luftdicht verschlossenen Ansätze analog zum KMB-Spaltungsexperiment inkubiert worden waren, wurde 1 ml Gas zur Quantifizierung des entstandenen Ethans mit einer luftdichten Spritze entnommen und gaschromatographisch bestimmt (Geräteanordnung siehe oben).

Saugversuch

In einem weiteren Experiment wurden Gerstenblätter (Sorte „Gunda“) mit einer geraden Schnittkante in einer 300 μM Testlösung für 3 h (mit Beleuchtung) inkubiert. Anschließend

wurden die Blattstücke in Wasser überführt und sowohl unter Lichteinfluss, als auch unter Lichtausschluss für 2 Tage beobachtet (Heiser et al., 2003).

2.10.3 Antibiotische Wirkung

Die antimykotische Wirksamkeit für Rubellin D wurde nach Chrysai-Tokousbalides & Kastanias (2003) an der Universität für Landwirtschaft Athen durchgeführt. Alle weiteren antimykotischen und antibakteriellen Tests erfolgten am Hans-Knöll-Institut Jena durch Dr. U. Möllmann bzw. an drei weiteren Standardkeimen durch Dr. B. Gitter (Biolitec AG, Jena) nach folgenden Versuchsanordnungen:

MIC-Test

In einem Vorversuch wurden relevante Organismen mittels Agar-Diffusionstest auf Sensitivität gegenüber den Substanzen getestet. Nach dem Suspendieren von 10^5 CFU/ml Testorganismen in temperiertem Müller-Hinton-Medium wurden die Kulturplatten gegossen. Nach Erstarrung des Mediums wurden Kavitäten ($\varnothing = 9$ mm) ausgestanzt und mit jeweils 50 µl Probenlösung (2,0 bzw. 0,2 mM) gefüllt. Die Größe der Hemmhöfe wurde nach 18-stündiger Inkubation bei 37 °C vermessen.

Zur Bestimmung der MIC-Werte wurden die Testsubstanzen in DMSO (Stammlösung: 1 mg/ml) aufgenommen und mit MeOH auf 0,4 mg/ml verdünnt. Weitere Verdünnungsschritte erfolgten mit Müller-Hinton-Medium in Mikrotiterplatten (NCCLS, 2000), sodass nach Zugabe der Organismen als Inokulum in Halbschritten abgestufte Konzentrationen von 200 µg/ml bis 1,6 µg/ml resultierten. Als Testorganismen wurden *Bacillus subtilis* (EHRENBERG) COHN (6633), *Staphylococcus aureus* ROSENBACH (SG 511 B3), *S. aureus* (134/94 MRSA), *Enterococcus faecalis* (ORLA-JENSEN) SCHLEIFER & KILPPER-BÄLZ (1528 VRSA), *Mycobacterium vaccae* BONICKE & JUHASZ (10670), *M. smegmatis* (TREVISAN) LEHMANN & NEUMANN (SG 987), *M. aurum* TSUKAMURA (SB 66), *M. fortuitum* DA COSTA CRUZ (M.fort.) verwendet. Alle genannten Organismen stammten aus dem Bestand des Hans-Knöll-Instituts Jena.

Um die Lichtabhängigkeit der Wirkung verdeutlichen zu können wurden ausgewählte Stämme (*B. subtilis* (6633), *S. aureus* (SG 511 B3), *E. faecalis* (1528 VRSA) und *M. vaccae* (10670)) jeweils unter Beleuchtung ($1,2 - 1,6 \times 10^{-4}$ W/cm²) sowie unter Lichtausschluss inkubiert, wobei hier in Halbschritten abgestufte Konzentrationen von 1000 µg/ml bis 4 µg/ml verwendet wurden.

Die Organismen wurden als Inokulum in Nährlösung (Glycerol 1 %, Fleischextrakt 0,5 %, Pankreas-verdautes Caseinpepton 0,5 %, NaCl 0,3 %, Aqua dest., pH 7,0) für 48 h bei 32 °C unter Agitation angezogen. Das Inokulum wurde mit McFarland-Standard 0,5 auf eine Endkonzentration in der Mikrotiterplatte von 5×10^5 CFU/ml eingestellt. Die Mikrotiterplatten wurden nach Inokulation der Verdünnungsreihen der Testsubstanzen mit den jeweiligen Testorganismen für 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit dem Plattenreader Nepheloscan Ascent 1.4 vermessen.

Die niedrigste Konzentration, bei der keine messbare Trübung bzw. kein Bewuchs mehr auftrat, wurde als minimale Hemmkonzentration (MIC) angegeben. Dabei wurde das Wachstum in den *wells* mit und ohne Testsubstanz verglichen. Referenzwerte (Inokulum ohne Testsubstanz und Lösungsmittel) und Blankwerte (ohne Inokulum) wurden jeweils als Kontrollen mitgeführt (NCCLS, 2000; Heinsch et al., 2002; Lange et al., 2004; Gottschaldt et al., 2006).

Kommerzielle Testkeime

Im Hinblick auf medizinische Nutzung wurden die Testsubstanzen auf ihre inhibitorische Fähigkeit gegenüber typischen Vertretern aus der Mikroflora von Verletzungswunden untersucht. Es handelte sich um die kommerziellen Keime *S. aureus* DSM1104 (ATCC 25923), den MRSA-Stamm *S. aureus* DSM11729 (ATCC 33592) und *Pseudomonas aeruginosa* (SCHRÖTER) MIGULA DSM1117 (ATCC 27853). Probenvorbereitung und Versuchsdurchführung erfolgten nach Schastak et al. (2008), jedoch unter Verwendung einer Kaltlichtlampe als Strahlungsquelle (Intensität: $2,5 \text{ W/cm}^2$, Bestrahlungszeit: 40 s) statt eines Lasers. Eine Dunkelkontrolle erfolgte mit der höchsten Testkonzentration von $100 \mu\text{M}$. Die Experimente wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.10.4 Proliferations- und Zytotoxizitätsassays

MTT-Proliferationsassay an MCF-7-Zellen

Mit dem von Mosmann (1983) erstmals beschriebenen MTT-Assay werden noch lebende Zellen erfasst. Bei Zugabe der gelben, wasserlöslichen Verbindung MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid, Thiazolylblau) erfolgt durch die nur in vitalen Zellen aktive mitochondriale Succinat-Dehydrogenase unter Spaltung der Tetrazolium-Struktur die Bildung eines violetten, wasserunlöslichen Formazans, das ein breites

Absorptionsmaximum bei etwa 550 - 620 nm aufweist (Abbildung 2.5). Bei Beachtung verschiedener Einflussfaktoren besteht über weite Bereiche ein linearer Zusammenhang zwischen der gebildeten Menge Formazan und der Lebendzellzahl (Mosmann, 1983; Denizot & Lang, 1986; Bruggisser et al., 2002).

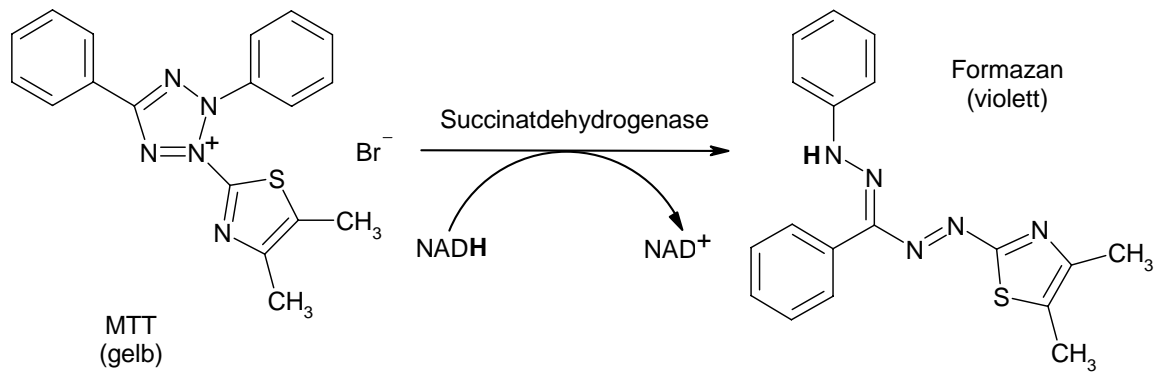


Abbildung 2.5: Testprinzip des MTT-Assays (verändert nach Roche Diagnostics, 2005a).

Nach entsprechender Verdünnung mit Normalmedium (DMEM mit Phenolrotzusatz + 10 % FCS + 1 % P/S) wurden 4000 Zellen der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 (ATCC) pro *well* einer 96*well*-Mikrotiterplatte ausgesät (entsprechend 150 µl Zellsuspension pro *well*) und im CO₂-Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) für 24 h inkubiert. Die Testsubstanzen wurden in entsprechender Konzentration im Verhältnis 1:1000 mit Medium (DMEM ohne Phenolrot + 10 % CSS + 1 % P/S) verdünnt (DMSO in einer Endkonzentration von 0,1 %). Diese Konzentration wurde auch für die substanzfreie 100 %-Kontrolle hergestellt. Als Positivkontrolle wurde 1 nM 17β-Estradiol mitgeführt. Nach 72 h erfolgte ein Wechsel der Probenlösungen ohne Waschschrift. Nach 120-stündiger Inkubation wurden Zellzahl-äquivalente mittels MTT-Methode bestimmt. Eine MTT-Stammlösung (5 mg/ml in PBS) wurde hierfür auf 0,5 mg/ml mit phenolrotfreiem DMEM verdünnt. Die Probenlösungen wurden abgesaugt und je *well* 100 µl MTT-Lösung zugegeben. Eine zellfreie Reihe wurde äquivalent behandelt, um für die spätere photometrische Bestimmung Blankwerte zu erhalten. Nach vierstündiger Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) erfolgte die Zugabe von je 100 µl einer 20%igen SDS-Lösung. Die photometrische Bestimmung erfolgte im MTP-Reader (LUMIstar Galaxy) bei 544 nm. Die ermittelten Absorptionswerte wurden blankbereinigt zur Lösungsmittelkontrolle (= 100%ige Proliferation) ins Verhältnis gesetzt. Je Substanzkonzentration erfolgte eine 6fach-Bestimmung (Gaubert et al., 2007).

LDH-Zytotoxizitätsassay an MCF-7-Zellen

Die quantitative Bestimmung zytotoxischer Effekte an MCF-7 Zellen erfolgte mit Hilfe des *Cytotoxicity Detection Kit*[®]. Hierbei wird die Enzymaktivität des in allen Zellen vorkommenden Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) bestimmt. Dieses Enzym wird nach Auflösung der Zellmembran mit dem Zytoplasma ins Außenmedium freigesetzt und kann kolorimetrisch bestimmt werden, wobei die Menge an freigesetztem Enzym direkt mit der Zahl lysierter Zellen korreliert. Die Bestimmung erfolgt durch die Bildung eines gefärbten, wasserlöslichen Formazansalzes, das bei 492 nm photometrisch vermessen werden kann und dessen Konzentration direkt mit der LDH-Aktivität und somit der Zahl lysierter (toter) Zellen korreliert (Abbildung 2.6).

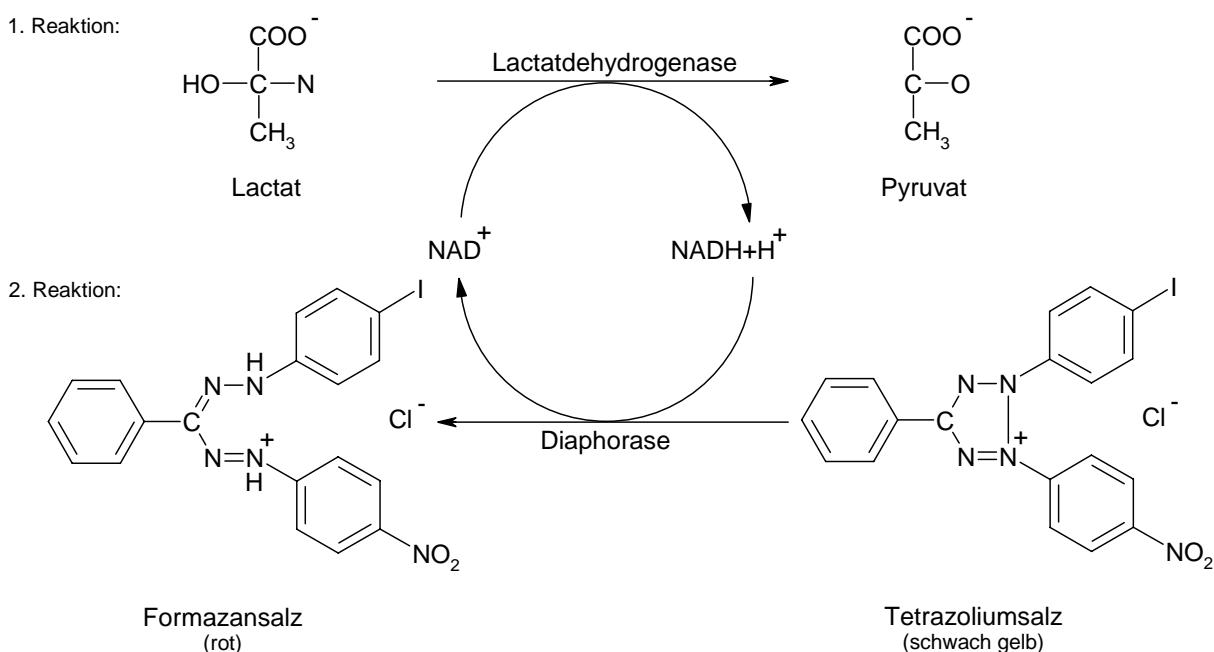


Abbildung 2.6: Testprinzip des LDH-Assays (verändert nach Roche Diagnostics, 2005b).

Nach entsprechender Verdünnung mit Medium (DMEM ohne Phenolrot + 1 % CSS + 1 % P/S) wurden 12000 MCF-7-Zellen pro *well* in einer 96*well*-Mikrotiterplatte ausgesät (entsprechend 150 µl Zellsuspension pro *well*) und im CO₂-Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) für 24 h inkubiert. Die Testsubstanzen wurden in entsprechender Konzentration im Verhältnis 1:1000 mit Medium (DMEM ohne Phenolrot + 1 % CSS + 1 % P/S) verdünnt (DMSO in einer Endkonzentration von 0,1 %). Zwei Kontrolllösungen wurden ebenfalls zugegeben: die Nullkontrolle (Lösungsmittelkontrolle), eine Lösung von 0,1 % DMSO in Medium und die 100 %-Kontrolle

(Maximalkontrolle), eine Lösung von 1 % Triton[®] X-100 in Medium, die zu einer vollständigen Lyse der Zellen führt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die nach der Anleitung des *Cytotoxicity Detection Kit*[®] (Package Insert, Version Juli 2005) hergestellten Reaktionslösungen (Katalyst mit Farbstofflösung gemischt im Verhältnis 1:45) zugegeben und die Platten für 25 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von je 50 µl 1 N HCl wurde die enzymatische Reaktion gestoppt und die Platten im MTP-Reader (HTS 7000) bei 492 nm photometrisch vermessen. Je Substanzkonzentration erfolgte eine Vierfachbestimmung. Die Experimente wurden dreifach wiederholt. Um den Einfluss der Substanzen auf die Reduktion des Tetrazoliumsalzes und damit die Testergebnisse zu ermitteln, wurden Probenlösungen ohne Zellen mit der Reagenzlösung analog der beschriebenen Vorgehensweise inkubiert und mit dem MTP-Reader photometrisch vermessen. Die so ermittelten „Eigenreduktionswerte“ wurden bei der Kalkulation der Zytotoxizitätswerte berücksichtigt. Die Berechnung wurde nach folgender Gleichung durchgeführt (Gaubé et al., 2007):

$$\text{Zytotoxizitätswert [\%]} = \frac{A_{\text{Probe}} - A_{\text{DMSO}} - A_{\text{Eigenreduktion}}}{A_{100\%} - A_{\text{DMSO}}} \times 100.$$

K-562-Zelltest

Als Suspensionskultur wachsende Zellen der humanen erythromyelozytäre Leukämie-Zelllinie K-562 (DSMZ Braunschweig, ACC 10) wurden mit verschiedenen Substanzkonzentrationen in Mikrotiterplatten ausgesät. Als Zellkulturmedium diente dabei RPMI 1640 unter Zusatz von stabilem L-Glutamin (GlutaMax-1), 10 % FCS und 25 µg/ml Gentamycinsulfat (BioWhittaker). Nach Einsaat der Zellen (10 000 Zellen/well) wurden die Mikrotestplatten für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Bestimmung der halbmaximalen Proliferationshemmung (GI₅₀) erfolgte die Messung der Extinktion im MTP-Reader (Sunrise, Tecan, 660 nm). Mit Hilfe der Auswertungssoftware Magellan (Tecan) wurden die GI₅₀-Daten (*growth inhibition*) durch Vergleich der jeweiligen Absorptionswerte mit dem Mittelwert der Zellkontrollen ermittelt (Dahse et al., 2001; Lange et al., 2004; Gottschaldt et al., 2006).

Huvec-Zelltest

Adhärent wachsende humane Endothelzellen aus der Umbilikalvene (ATCC) wurden in einer Zelldichte von 10 000 Zellen/*well* in eine 96*well*-Mikrotiterplatte mit verschiedenen Verdünnungsstufen der Testsubstanzen ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 72 h inkubiert. Als Kulturmedium wurde DMEM mit 10 % FCS, Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), Fungizone (250 ng/ml), sowie L-Glutamin verwendet. Zur Bestimmung der halbmaximalen Proliferationshemmung (GI₅₀) erfolgte die Messung der Extinktion im MTP-Reader (Sunrise, Tecan, 660 nm). Mit Hilfe der Auswertungssoftware Magellan (Tecan) wurden die GI₅₀-Werte (*growth inhibition*) durch Vergleich der jeweiligen Absorptionswerte mit dem Mittelwert der Zellkontrollen ermittelt (Dahse et al., 2001; Manuelian et al., 2003).

HeLa-Zelltest

In eine 96*well*-Mikrotiterplatte wurden 4000 Zellen/*well* der humanen endothelialen Zervixkarzinomzelllinie HeLa (DSMZ Braunschweig, ACC 57) in je 200 µl Kulturmedium RPMI 1640 unter Zusatz von stabilem L-Glutamin (GlutaMax-1), 10 % FCS und 25 µg/ml Gentamycinsulfat (BioWhittaker) ausgesät. Die Mikrotiterplatten wurden ohne Testsubstanz bei 37 °C und 5 % CO₂ für 48 h (unter physiologischen Bedingungen) inkubiert, um eine subkonfluente Monolayer zu erzeugen. Danach wurden die Monolayer mit verschiedenen Verdünnungsstufen der Testsubstanzen versetzt und für weiter 72 h inkubiert. Dann erfolgte die Fixierung der Zellen mit einer 25%igen Glutaraldehydlösung, anschließende Färbung mit einer 0,05%igen Methylenblaulösung und die photometrische Bestimmung bei 630 nm in einem MTP-Reader (Sunrise, Tecan). Mit Hilfe der Auswertungssoftware Magellan (Tecan) wurden die CC₅₀-Werte (*cytotoxic concentration*) durch Vergleich der jeweiligen Absorptionswerte mit dem Mittelwert der Zellkontrollen bestimmt (Dahse et al., 2001; Lange et al., 2004; Gottschaldt et al., 2006).

SK-Zelltest

Je 6 mg Substanzprobe wurden in 600 µl MeOH gelöst und 200 µl dieser Stammlösung in 1 ml Zellkulturmedium (MEM; 0,3 % DMSO, 1,7 % EtOH) überführt. Ausgehend von dieser Konzentration wurden log₂-Verdünnungen hergestellt und in einem MTT-Zellkulturtest (Messprinzip siehe oben) an Schweinenierenzellen (SK-Zellen) getestet (höchste Testkonzentration: 1 mg/ml). Der Test wurde unter Standardbedingungen (Gareis, 2006) durchgeführt. Als Positivkontrollen wurden standardisierte Konzentrationen der Mykotoxine Gliotoxin, Patulin und Deoxynivalenol mitgetestet.

Weiterhin wurde der Lichteinfluss auf die biologische Aktivität der Substanzen untersucht. Hierzu wurde ein Inkubationsschrank mit einer Osram Dulux FL Longlife Lampe (11 W) ausgerüstet, wobei die Beleuchtungsintensität $1,2 - 1,6 \times 10^{-4} \text{ W/cm}^2$ betrug. Die Inkubation der Zellen mit den Substanzen erfolgte über einen Zeitraum von 44 h bei 37°C und 5 % CO_2 . Vor der Durchführung der kolorimetrischen Reaktion mit MTT erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Zellkulturlayer, um eventuelle Interaktionen zwischen den jeweiligen Testsubstanzen und MTT-Reagenz auszuschließen.

HIG-82-, HT29- und J774A.1-Zelltests

Bei diesen Experimenten wurde ein XTT-Test verwendet, bei dem es sich ebenfalls um einen Assay zur Bestimmung der Zellvitalität handelt. XTT ist ein dem MTT strukturell sehr ähnliches Tetrazoliumsalz, aus dem unter Enzymeinwirkung ebenfalls ein Formazan-Farbstoff gebildet wird (Messprinzip siehe oben). Die Menge an gebildetem Farbstoff ist auch hier direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen. XTT hat gegenüber MTT den Vorteil, dass es wasserlöslich ist und nicht in DMSO gelöst werden muss. Auch wenn XTT schlechter als MTT von vielen Zelllinien metabolisiert wird, so kann durch Zugabe von Phenazinmethosulfat (PMS) eine ausreichende Reduktion durch die Zellen erzielt werden, wobei PMS den Umsatz von XTT nicht beeinflusst (Scudiero et al., 1988; Jost et al., 1992).

Für diese Untersuchungen wurden Zellen der Kaninchen-Synviocyten-Zelllinie HIG-82, der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 und der murinen Makrophagen-Zelllinie J774A.1 verwendet. Die Anzucht der Zellen erfolgte mit DMEM (10 % FCS, 1 % (v/v^{-1}) Penicillin (10 000 IU), Streptomycin (10 mg/ml) in einem Brutschrank (5 % CO_2 , 37°C). Drei Tage vor Behandlung mit den Testsubstanzen wurden 2×10^3 Zellen/well in eine Mikrotiterplatte ausgesät. Aus einer Stammlösung von 2 mM Testsubstanz in DMSO (Lagerung bei 4°C ohne Licht) wurden Verdünnungen mit RPMI-Medium (ohne Phenolrot, mit 10 % FCS) auf Endkonzentrationen von 2 bzw. 10 μM hergestellt und auf die Zellmonolayer appliziert. Nach 24-stündiger Dunkelinkubation wurde das Medium abgesaugt und durch RPMI (ohne Phenolrot und 10 % FCS) ersetzt, anschließend wurde der Ansatz mit einer Kaltlichtlampe (Intensität: $2,5 \text{ W/cm}^2$, Bestrahlungszeit: 40 s) bestrahlt. Nach weiterer Inkubation im Brutschrank (5 % CO_2 , 37°C) für 24 h wurde der Zellvitalitätstest mit XTT durchgeführt (Roehm et al., 1991).

Zur Vorbereitung wurden 500 mg XTT in 500 ml PBS-Puffer (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gelöst und sterilfiltriert. Die XTT-Lösung wurde anschließend in einem Wasserbad auf 37°C temperiert und mit einer PMS-Aktivierungslösung (0,383 mg PMS in 1,0 ml PBS-Puffer) versetzt (für

96well-Mikrotiterplatte 0,1 ml PMS-Aktivierungslösung und 5 ml XTT-Lösung). Das Zellmedium wurde aus der Mikrotiterplatte entfernt und durch 100 µl RPMI (ohne Phenolrot, 10 % FCS) und 50 µl XTT-PMS-Reaktionslösung ersetzt und wiederholt für 2 - 3 h bis zur Bildung des orangefarbenen Formazans inkubiert (5 % CO₂, 37 °C). Nach kurzer Agitation zur gleichmäßigen Verteilung des Farbstoffes wurden die Absorptionswerte mit einem MTP-Reader (Bio-Kinetiks Reader) bei 490 nm bestimmt.

2.10.5 Tau-Aggregation

Die Testsubstanzen sowie die Referenz Daunorubicin wurden in einem Thioflavin-S-Assay (Friedhoff et al., 1998) untersucht. Hierbei wurde die Fähigkeit der Verbindungen, vorgefertigte Tau-Aggregate aufzulösen bzw. die Aggregation des Tau-Proteins zu unterbinden, untersucht. Der gewählte Konzentrationsbereich betrug 200 µM bis 100 pM. Weiterhin wurden die Zytotoxizitätswerte der Substanzen an der murinen Neuroblastomzelllinie N2A mit einem LDH-Assay (Inkubation über 5 h, Messprinzip siehe 2.10.4) bestimmt. Eine Zytotoxizität von 100 % entsprach hierbei einer Behandlung der Zellen mit 5 % Triton X-100.

2.10.6 Antivirale Wirkung

Die Bestimmung der antiviralen Aktivität wurde in Anlehnung an die von Schmidtke et al. (2001) beschriebene Methode des zpE-Hemmtests durchgeführt. Alle Verbindungen wurden in einem Zytotoxizitätsassay im Konzentrationsbereich von 0,2 bis 50 µg/ml getestet, um weiterführend im zpE-Hemmtest die Stoffe unterhalb der maximal tolerierten Dosis (CC₁₀) überprüfen zu können.

Zytotoxizitätsassay an HeLa Ohio-, MDCK- und GMK-Zellmonolayern

Zellen der humanen Zervixkarzinomzelllinie HeLa Ohio, der Hundenierenzelllinie MDCK, sowie der von der grünen Meerkatze stammenden Nierenzelllinie GMK wurden in Mikrotiterplatten ausgesät und im Brutschrank (5 % CO₂, 37 °C) zur Ausbildung eines Monolayers für 48 h vorinkubiert (HeLa Ohio Zellen in MEM und MDCK bzw. GMK-Zellen in DMEM-Medium jeweils unter Zusatz von 10 % FCS). Danach wurde das Medium entfernt und die Substanzen in verschiedenen Konzentrationen in Kulturmedium aufgetragen. Für eine 6fach-Kontrollwertbestimmung wurde jeweils 100 µl Medium eingesetzt. 72 h nach Substanzapplikation und Inkubation erfolgte die Färbung der Zellen mit Kristallviolett/Methanol (Nain et al., 1990). Nach dem Herauslösen des Farbstoffes wurden die

Absorptionswerte der einzelnen *wells* mittels MTP-Reader (MR7000) bei 550 bzw. 630 nm photometrisch gemessen und mit dem Mittelwert der Zellkontrollen verglichen. Der Mittelwert der Kontrollen wurde als 100 % Vitalität angenommen. Bestimmt wurden die halbmaximale zytotoxische Konzentration (CC₅₀) sowie die maximal tolerierte Dosis (CC₁₀).

Antivirale Wirkung im zpE-Hemmtest

Antivirale Wirkungen der isolierten Verbindungen wurden in drei Testsystemen (100 µl Testlösung pro *well*, 2 Parallelen pro Konzentration und Verdünnungsfaktor 2) untersucht: HeLa-Zellen/Coxsackie-Virus B3 Nancy (CVB3), HeLa-Zellen/Polio-Virus-Typ 2 (Polio 2) und HeLa-Zellen/Polio-Virus-Typ 3 (Polio 3).

Die Replikation der im Test verwendeten Viren führt zur kompletten Zerstörung der Wirtszellen, einem stark ausgeprägten zytopathischen Effekt (zpE). Durch die Zugabe antiviral wirksamer Substanzen lässt sich der Virus-induzierte zpE gezielt hemmen. Im Test wurden mit Substanz behandelte geschlossene Zellrasen mit einer Virusdosis beimpft, welche 24 h (CVB3) bzw. 48 h (Polio-Viren) nach Infektion zu einem vollständigen zpE in den unbehandelten Viruskontrollen führt. Zu diesem Zeitpunkt wurden die noch adhärennten Zellen mit einer Kristallviolett/Formalin Lösung fixiert und gefärbt (Nain et al., 1990). Die Hemmung des Virus-induzierten zpE wurde nach Farbstoffelution photometrisch in einem MTP-Reader (MR7000) bei 550 bzw. 630 nm quantifiziert. Die Berechnung der antiviralen Wirkung erfolgte durch einen Vergleich der optischen Dichten von behandelten und unbehandelten, infizierten Zellen mit der durchschnittlichen optischen Dichte der Zellkontrollen, welche als 100 % Vitalität angesehen wurden (Pauwels et al., 1988). Als interne Testkontrolle wurde auf jeder Mikrotiterplatte das Virusstatikum Guanidinhydrochlorid als Positivkontrolle mitgeführt.

2.11 Geräte und Chemikalien

2.11.1 Geräte

Agar-Platten	Rotilabo®-Petrischalen (Ø = 90 mm, h = 14 mm) (Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
Autoklav	Dampfsterilisator (VEB MLW Medizinische Geräte, Berlin)
Baker-Säulen-System	Baker SPE-12G-System, Säulen: Bakerbond spe (Ø = 1,4 cm, h = 4,0 cm) (J.T. Baker GmbH, Groß-Gerau)
CO ₂ -Inkubator	CO ₂ Single Chamber Water Jacketed Incubator, Model 3121 (Forma Scientific, Marietta, OH, USA)
DC-Auftragegerät	AS 30 TLC-Applikator (Desaga, Heidelberg)
DC-Kammern	Doppeltrogkammer 20 x 10 cm, 10 x 10 cm (CAMAG, Berlin)
DC-UV-Detektion	HP-UVis mit UV Lampen 254/366 nm (Desaga Sarstedt-Gruppe, Heidelberg)
Digitalkamera	FinePix 2600 (Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf)
DNA-Kapillarsequenzier	ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom)
Feinwaagen	Sartorius H160 (Sartorius AG, Göttingen) Sartorius AC120S (Sartorius AG, Göttingen)
Filterpapier	S & S Rundfilter 597, 597½ (Schleicher & Schuell Micro-Science GmbH, Dassel)
Flüssig-Szintillator	Liquid Scintillation Analyzer TRI-CARB 2100 TR (Canberra-Packard GmbH, Dreieich)
Gaschromatograph	Varian Aerograph 3300 (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA)
Gelfiltration	Pumpe MS-4 REGLO/8-100 (ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Glattbrugg-Zürich, Schweiz), UV/Vis-Detektor UA-6, Fraktionssammler FOXY JR. (ISCO Inc., Superior, St. Lincoln, NE, USA)
Glassäulen (Gelfiltration)	Analytische Säule: Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden (Ø = 1,60 cm, h = 90 cm) Präparative Säule: Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden (Ø = 2,60 cm, h = 90 cm);

Glassäulen (Normal-Phase)	Analytische Säule: W. Kranich GmbH & Co. KG, Göttingen (Ø = 2,0 cm, h = 25,0 cm) Präparative Säule: eigene Herstellung (Rainer Schau, FSU Jena) (Ø = 5,5 cm, h = 21,0 cm)
Gefriertrocknung	Christ Alpha 1-2, Christ Alpha 2-4 (Christ Gefriertrocknungs- anlagen GmbH, Osterode), Freezemobile (Virtis, Gardiner, NY, USA)
Gelelektrophorese	Kammer: ExM und ExW (Peqlab, Erlangen), Stromversorgung: EV231 (Consort NV, Turnhout, Belgien)
Geldokumentation	Gel Jet Imager 2004 (Intas, Göttingen)
Glucosegehalts- bestimmung	ECA 2000 (Prüfgerätewerk Medingen GmbH, Dresden)
Heizpilze	Electrothermal 100/250/500/1000 ml (Electrothermal Engineering Ltd., Essex, England)
HPLC-Anlage 1	Shimadzu VP-Class: System Controller SCL-10A VP, Diode Array Detector SPD-M10A VP, Pumpe LC-10AT VP, Schalt- ventil FCV-10AL VP, Säulenofen CTO-10AS VP, Degasser GT- 154, Software Class VP Version 6.12 SP5 (SHIMADZU Europa GmbH, Duisburg)
HPLC-Anlage 2	System Controller SCL-6B, Detektor SPD-6AV, 2 Pumpen LC- A7, Chromatopac C-R4A, Fluorescence HPLC-Monitor RF-535, Software V2.7 (SHIMADZU Europa GmbH, Duisburg)
IR-Spektrometer 1	Nicolet Avatar 370 DT GS (Thermo Nicolet, Madison, WI, USA)
IR-Spektrometer 2	BIORAD FTS-25 (Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA), ATR- Küvette
Inkubationsschrank	IR 1500 Automatic (ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim)
Kaltlichtlampe	KL2500 LCD (Schott Instruments GmbH, Mainz)
Magnetrührer	KMO 2 basic (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen)
Massenspektrometer	Massenspektrometer Typ LQC (Thermo Electron GmbH, Dreieich) TSQ Quantum AM (Thermo Electron GmbH, Dreieich)
Membranfilter	Spartan 30/0,45 µm RC, Spartan 3/0,45 µm PA (Schleicher & Schuell MicroScience GmbH, Dassel)
Mikroskop	Amplival® Plan (Carl Zeiss Jena)

Mikrotiterplatten	NUNC TM (Nunc ALS, Roskilde, Dänemark) CELLSTAR [®] (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
MTP-Reader	Bio-Kinetics Reader EL312 e (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) HTS 7000 BioAssay Reader (Perkin Elmer GmbH, Überlingen) LUMIStar Galaxy (BMG Labtechnologies, Offenburg) MR7000 (Dynex Technologies GmbH, Berlin) Nepheloscan Ascent 1.4 (Thermo Labsystems, Vantaa, Finnland) Sunrise TM (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz)
NMR-Anlage	Bruker AVANCE 400 Spektrometer, ASPEKT-Station, Bruker TOPSPIN Software (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten)
NMR-Röhrchen	Teflonventil-Röhrchen (Ø = 5,0 mm, l = 178 mm) (Deutero GmbH, Kastellaun)
PCR-Thermocycler	Biometra Thermocycler T1 (biometrische Analytik GmbH, Göttingen) Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg)
Perforator-Kühlung	PARALAQUA [®] (Van der Heijden-Labortechnik GmbH, Dörentrup)
pH-Messgerät	pH-Meter: pH 315i, pH-Elektrode: SenTix 81 (WTW GmbH, Weilheim)
Polarimeter	elopton Polartronic-E (Schmidt & Haensch GmbH & Co., Berlin)
Radiometer	Research Radiometer IL-1700 (UV Process Supply Inc., Chicago, IL, USA), Messzelle: SED-33
Reinstwasser-Analge	ELGASTAT UHQ PS (Elga Ltd., High Wycombe, England)
Rotationsverdampfer	Pumpensystem: Vacuubrand PC 2001 Vario (Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim), Rotacool, WB 2000, VV 2000 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
Rundschüttler	INFORS TR-125 (Infors AG, Bottmingen, Schweiz)
sterile Werkbank (LAF)	CA/REV 4-Sicherheitswerkbank Klasse II (Clean Air GmbH, Hilden)
Trockenschränke	UM500 (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach), WST 3010 (VEB MLW Medizinische Geräte, Berlin)
Ultraschallbad	Sonorex TK 52 (Bandelin electronic, Berlin)
Ultra-Turrax	T25 basic (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen)

UV/Vis-Spektrometer	UV-160A (SHIMADZU Europa GmbH, Duisburg), Küvette: SUPRASIL™ 100-QS (1 cm) (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim)
Verdünnungsgerät	Microlab 500, (Hamilton GmbH, Martinsried)
Vortexer	Vortex Genie 2 G-560E (Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA)
Zentrifugen	Universal 30 RF (Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen) T23 (Janetzki KG, Engelsdorf-Leipzig) Eppendorf Centrifuge 5415 D (Eppendorf, Hamburg)

2.11.2 Stationäre Phasen

Alle aufgelisteten Luna™-Säulen wurden von Phenomenex Inc. (Torrance, CA, USA) bezogen und unter Verwendung der entsprechenden Vorsäulen verwendet.

Sephadex® LH-20	Partikelgröße 25 - 100 µm (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
Kieselgel 60	Partikelgröße 0,063 - 200 µm (Merck KGaA, Darmstadt)
LiChroprep®	RP-18, Partikelgröße 25 - 40 µm (Merck KGaA, Darmstadt)

Dünnschichtchromatographie

Kieselgel 60 F ₂₅₄	DC-Aluminiumfolien (Schichtdicke 0,2 mm) (Merck KGaA, Darmstadt)
Kieselgel 60 ADAMANT	DC-Fertigplatten ADAMANT (Schichtdicke 0,25 mm, auf Glas) (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)
RP-18 F ₂₅₄ S	DC-Aluminiumfolien (Schichtdicke 0,16 - 0,2 mm) (Merck KGaA, Darmstadt)

Analytische HPLC-Säule

Vorsäulen	SecurityGuard™ Phenomenex® C18(2) 5 µm (Ø = 4 mm, h = 3 mm) (Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg)
Hauptsäulen	Luna Phenomenex® C18(2) 5 µm (Ø = 4 mm, h = 250 mm) (Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg)

Semipräparative HPLC-Säule

Vorsäulen	SecurityGuard™ Phenomenex® C18(2) (Ø = 10 mm, h = 10 mm) (Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg)
Säulen	Luna™ Phenomenex® C 18(2) 100 Å 5 µm (Ø = 15 mm, h = 250 mm) (Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg)

Präparative HPLC-Säule

Vorsäulen	SecurityGuard PREP™ Phenomenex® C18(2) (Ø = 21,2 mm, h = 15 mm) (Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg)
Säulen	Luna™ Phenomenex® C18(2) 10 µm (21,2 x 250 mm) (Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg)

2.11.3 Laufmittel

Tabelle 2.8: Laufmittelzusammensetzung für DC (Kieselgel 60 und RP-18), LH-20 sowie analytische und präparative HPLC.

Stationäre Phasen	Laufmittel	Zusammensetzung	Verhältnis
DC (Kieselgel 60)	LM A ₁	EtOAc/MeOH/H ₂ O	100:4:2
	LM A ₂	EtOAc/MeOH/H ₂ O	100:17:13
DC (RP-18)	LM B ₁	MeOH/H ₂ O	3:1
	LM B ₂	MeOH/H ₂ O	9:1
LH-20	LM C ₁	MeOH/n-PrOH	1:1
	LM C ₂	MeOH/n-PrOH/HCOOH	100:100:1
HPLC (RP-18)	LM D ₁	MeOH/MeCN/H ₂ O/HCOOH	16:4:5:1/8
	LM D ₂	MeOH / MeCN / H ₂ O	16:4:5
	LM D ₃	MeOH/MeCN/H ₂ O	Gradientenelution (präparativ): 0 - 3,4 min (16:4:7) 3,4 - 18 min (16:4:7 → 16:4:1)
	LM D ₄	MeOH/MeCN/H ₂ O	Gradientenelution (analytisch): 0 - 2 min (16:4:7) 2 - 10 min (16:4:7 → 16:4:1)
	LM D ₅	MeOH/MeCN/H ₂ O	16:4:1

2.11.4 Chemikalien, Pufferlösungen, Medien

Die Lösungsmittel für die chemischen und analytischen Verfahren entsprachen der p.a.-Qualität und wurden von Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Laborchemie Apolda (Apolda) bezogen. Für die HPLC-Messungen wurden Lösungsmittel geeigneter Reinheit (HPLC *Gradient Grade*) verwendet (Roth, Karlsruhe oder Merck, Darmstadt) bzw. *Aqua purificata* über eine Reinstwasseranlage gewonnen.

Herstellung von CSS (nach Gaube et al., 2007):

FCS wurde mit 0,5 % Aktivkohle und 0,05 % Dextran T70 versetzt und 60 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und 10 min. zentrifugiert (3000 rpm). Der Überstand wurde zweifach sterilfiltriert (0,22 µM-PES-Filter). Durch diese Behandlung wird eine Reduktion des Estrogengehaltes um 96 - 98 % erreicht (Eckert & Katzenellenbogen, 1982; Olsen et al., 2003).

Agar-Agar	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DNA-Größenmarker	100 bp DNA-Ladder (G2101), Promega GmbH, Mannheim
dNTP-Mix	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Ethidiumbromidlösung 1%	Roth GmbH & Co., Karlsruhe [Ethylenbis(oxyethylenitrilo)]-tetraessigsäure
FCS (fötales Kälberserum)	Gibco™, Invitrogen GmbH, Karlsruhe Biochrom AG, Berlin
Gemüsesaft	ALBI®-Gemüsesaft (Albi GmbH & Co., Bühlenhausen)
Gentamycinsulfat	BioWhittaker Inc., Walkersville, MD, USA
LB-Medium (1000 ml)	10 g bakterielles Pepton, 5 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl, (13 g Agar-Agar nur bei Agarplatten), 100 mg Ampicillin, 50 mg Kanamycin
L-Glutamin	GlutaMax-1, Gibco™, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
McFarland Standard 0,5	BioMerieux GmbH, Nürtingen
MTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Roth GmbH & Co., Karlsruhe
PBS (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	AppliChem GmbH, Darmstadt Biochrom AG, Berlin
PMS	AppliChem GmbH, Darmstadt
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,5
TBE-Puffer	90 mM Trisborat, 1 mM EDTA, pH 8,3
Triton® X-100	Ferak Berlin GmbH, Berlin

Müller-Hinton-Medium	Difco Lab., Detroit, MI, USA
XTT	AppliChem GmbH, Darmstadt
Zellkulturmedium	RPMI 1640 Gibco™, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
	Eagle's minimal essential medium (MEM), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, mit Phenolrotzusatz, 4,5 g/l Glucose, mit stabilem Glutamin), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
	DMEM (ohne Phenolrotzusatz, ohne Natriumpyruvat, mit stabilem Glutamin) Gibco™, Invitrogen GmbH, Karlsruhe

deuterierte Lösungsmittel

Acetonitril- d_3	(CD_3CN) 99,9 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid- d_6	((CD_3) $_2SO$) 99,8 %, Euriso-top GmbH, Saarbrücken
Methanol- d_4	(CD_3OH) 99,8 %, Chemotrade Chemiehandelsgesellschaft mbH, Leipzig
Tetrahydrofuran- d_8	(C_4D_8O) 99,6 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Chloroform- d_1	($CDCl_3$) 99,96 %, Euriso-top GmbH, Saarbrücken

Isotope

[1- ^{14}C]-Acetat	($CH_3^{14}COONa$) DuPont/NEN Company Boston, MA, USA
[1- ^{13}C]-Acetat	($CH_3^{13}COONa$) 99 %, Cambridge Isotope Labs Inc., Andover, MA, USA
[2- ^{13}C]-Acetat	($^{13}CH_3COONa$) 99 %, Cambridge Isotope Labs Inc., Andover, MA, USA
[U- $^{13}C_6$] D-Glucose	($^{13}C_6H_{12}O_6$) 99 %, Cambridge Isotope Labs Inc., Andover, MA, USA

Antibiotika

Chlortetracyclin-	
hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Penicillin-G-Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Streptomycinsulfat	Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	(10 000 E/10 mg/ml) (P/S) Biochrom AG, Berlin

Pufferlösungen

ESAT/ECA-Pufferlösung	Glucose-Lactat-Pufferlösung (P-D Industriegesellschaft mbH, Prüfgesellschaft Dresden)
Szintillatorlösung	Ultima TM Gold LSC Cocktail (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
Sörensen-Phosphat-Puffer	pH 5,4; 66 mM

2.11.5 Primer und Reagenzienkits*Primer*

Alle verwendeten Primer wurden von Metabion international AG, Martinsried bezogen. Die gefriergetrockneten Oligonucleotide wurden in den entsprechenden Volumina Wasser zu einer Konzentration von 100 pmol/μl gelöst.

(M = A, C; N = A, G, C, T; R = A, G; S = G, C; Y = C, T; I = Inosin)

β-Ketoacylsynthase-Primer (Amnuaykanjanasin et al., 2005)

KAF1	5'-GAR KSI CAY GGI ACI GGI AC-3'
KAF2	5'-GAR GCI CAY GCI ACI TCI AC-3'
KAR1	5'-CCA YTG IGC ICC RTG ICC IGA RAA-3'
KAR2	5'-CCA YTG IGC ICC YTG ICC IGT RAA-3'

ITS-Primer (White et al., 1990)

ITS1	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'
ITS4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'
ITS5	5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'

Sequenzierprimer (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

M13-Forward	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'
M13-Reverse	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'

Reagenzienkits

Triple Master Mix	TripleMaster [®] PCR System (Eppendorf AG, Hamburg)
Gelextraktion	Gel Extraction Kit QIAquick [®] (Qiagen GmbH, Hilden)
Klonierung	TOPO TA Cloning Kit, pCR4-Topo Vector (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
DNA-Extraktion	DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
LDH-Assay	
Zytotoxizitätsbestimmung	Cytotoxicity Detection Kit [®] (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
Taq-DNA-Polymerase	QBiogene, Heidelberg
Plasmid-Extraktion	Perfectprep plasmid mini kit (Eppendorf AG, Hamburg)
Sequenzierungskit	Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom)

2.11.6 Zelllinien und Virenstämme*Zelllinien*

GMK (*green monkey kidney cell line*, Nieren-Zelllinie aus der grünen Meerkatze)

Schaper & Brümmer, Salzgitter

Huvec (*human umbilical vein endothelial cells*, humane Endothelzellen aus der

Umbilikalvene) American Type Culture Collection, Mannassas, VA, USA

HeLa (*human cervix carcinoma cell line*, humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms)

ACC 57, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

HeLa Ohio (*human cervix carcinoma cell line*, humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms)

CCL-2, American Type Culture Collection, Mannassas, VA, USA

HIG-82 (*rabbit synovial cell line*, Synoviozyten- (Fibroblasten) Zellen aus Kaninchen)

CRL-1832, American Type Culture Collection, Mannassas, VA, USA

HT29 (*human colon adenocarcinoma cell line*, humane Darmkrebszelllinie)

ACC 299, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

J774A.1 (*mouse monocytes-macrophages cell line*, murine Makrophagen-Zelllinie)

ACC 170, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

K-562 (*human chronic myeloid leukemia cell line*, humane erythromyelozytäre Leukämie-Zelllinie) ACC 10, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

MCF-7 (*human breast adenocarcinoma cell line*, humane Brustkrebszelllinie)

HTB-22, American Type Culture Collection, Mannassas, VA, USA

MDCK (*Madin-Darby canine kidney cell line*, Hundenieren-Zelllinie)

Institut für Influenza-Viren, St. Petersburg, Russland

N2A (*mouse neuroblastoma cell line*, murine Neuroblastom-Zelllinie)

Max-Planck-Institut für strukturelle Molekularbiologie, Hamburg

SK (*swine kidney cell line*, Schweinenieren-Zelllinie)

Bundesanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Institut für Mikrobiologie und Toxikologie, Kulmbach

Virenstämme

Coxsackie-Virus B3 Nancy (CVB3) in HeLa Ohio-Zellen

Institut für Poliomyelitis und Virusencephalitis, Moskau, Russland

Polio-Virus Typ 2 in HeLa Ohio-Zellen

Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Polio-Virus Typ 3 in HeLa Ohio-Zellen

Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Friedrich-Schiller-Universität Jena

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Extraktion und Isolierung

Für die Charakterisierung respektive Strukturaufklärung von relevanten Sekundärmetaboliten bzw. deren qualitative und quantitative Untersuchung in Mycel- und Kulturfiltratextrakten wurde ein spezielles Isolierungsschema entwickelt, das für beide *Ramularia*-Arten gleichermaßen Anwendung fand (Abbildung 3.1). Nach Trennung von Kulturfiltrat und Mycel wurden beide Ansätze mit EtOAc kontinuierlich und erschöpfend extrahiert und anschließend über Kieselgel 60 vorfraktioniert. Auf diese Weise konnten relativ hydrophile Verbindungen abgetrennt werden. Zur präparativen HPLC-Trennung kamen je nach Polarität der Verbindungen verschiedene Systeme zum Einsatz (siehe Kapitel 2.3.3). Die weiteren Aufarbeitungsschritte wurden analog zu den bereits beschriebenen Methoden durchgeführt. Wenn nötig, wurden rechromatographische Schritte durchgeführt. Zur abschließenden Reinigung erfolgte eine Gelfiltration über Sephadex[®] LH-20 (siehe Kapitel 2.3.4). Zur Isolation der polaren Substanzen Rubellin E bzw. F wurde ein modifiziertes Aufarbeitungsverfahren verwendet. Hierbei wurde das Kulturfiltrat lyophilisiert und anschließend mit MeOH anstatt EtOAc erschöpfend extrahiert.

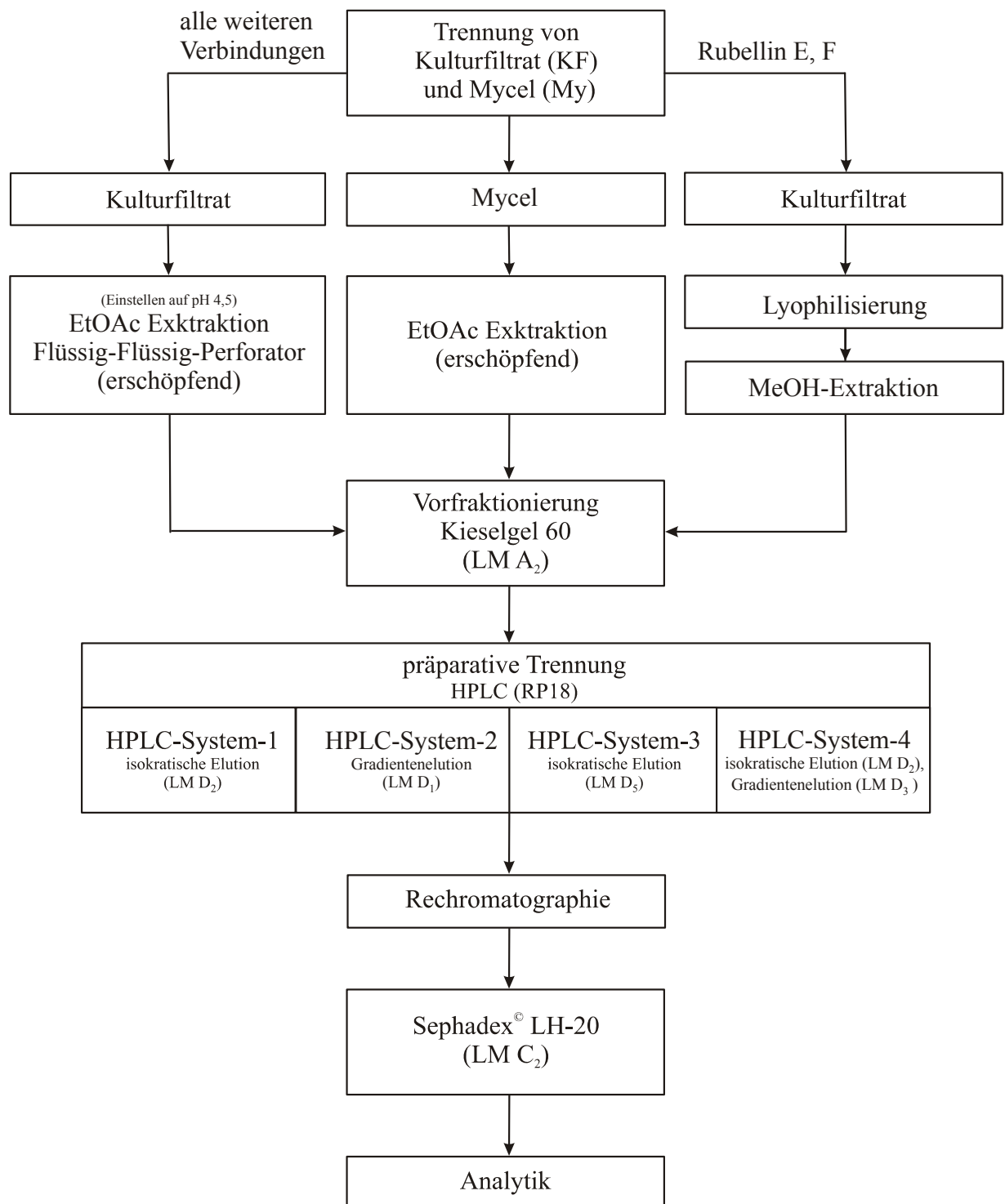


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Extraktions- und Isolierungsmethoden.

3.2 Analytik und Strukturaufklärung

Die Strukturformelbilder der isolierten Verbindungen sind zusammengefasst in Kapitel 3.3 (Abbildung 3.15) dargestellt.

3.2.1 Chromatographische Daten

Alle isolierten Sekundärmetabolite konnten gut chromatographisch voneinander getrennt und qualitativ bzw. quantitativ charakterisiert werden. Es wurden verschiedene Verfahren wie z. B. DC, HPLC oder Größenausschluss-Chromatographie (wobei allerdings auch Adsorptionsprozesse eine Rolle spielen) angewendet. Einen Überblick über das chromatographische Verhalten der Verbindungen auf DC-Platten mit Normal- bzw. Umkehrphasen geben Tabelle 3.1 und Abbildung 3.2. Im Vergleich dazu sind die entsprechenden HPLC-Daten bzw. Retentionszeiten (inklusive Kalibriergeraden) in Tabelle 3.2 aufgeführt. Es wurden verschiedene mobile Phasen getestet, wobei sich die in Tabelle 2.8 gelisteten Laufmittel als günstig erwiesen. Die Eigenfärbung der Metabolite (siehe Kapitel 3.2.2) ermöglichte mitunter eine visuelle Detektion bei den chromatographischen Verfahren DC und Gelfiltration. In diesem Zusammenhang hervorzuheben sind die beiden relativ unpolaren Verbindungen Helminthosporin und Chrysophanol. Beide konnten *via* präparativer HPLC mit einem modifizierten Verfahren sehr gut von den anderen Verbindungen getrennt werden, wobei in der MS-Untersuchung jeweils eine Verunreinigung mit Palmitinsäure ($m/z = 255,2298$ $[M-H^+]$, errechnet für $C_{16}H_{31}O_2$ 255,2324) bzw. Ölsäure ($m/z = 281,2471$ $[M-H^+]$, errechnet für $C_{18}H_{33}O_2$ 281,2481) nachgewiesen werden konnte. Diese Fettsäuren wurden durch eine Festphasenextraktion über RP-18 (Bakerbond) mit MeOH/H₂O (3:1) abgetrennt.

Bezüglich der Isolation, Detektion und der damit verbundenen Quantifizierung der Substanzen wurden Kalibriergeraden mit der analytischen HPLC und hochreinen Referenzverbindungen (eigener Herstellung) erstellt. Die jeweiligen Geradengleichungen und R^2 -Werte finden sich ebenfalls in Tabelle 3.2.

Tabelle 3.1: Dünnschichtchromatographische Daten der isolierten Sekundärmetabolite.

Verbindung	KG60 Adamant (LM A ₂)	RP-18 (LM B ₁)
	R _F -Wert	R _F -Wert
Rubellin A	0,93	0,17
Rubellin B	0,94	0,11
Rubellin C	0,77	0,24
Rubellin D	0,78	0,18
14-Dehydrorubellin D	0,91	0,16
Rubellin E	0,41	0,48
Rubellin F	0,38	0,52
Caeruleoramularin I	0,60	0,43
Caeruleoramularin II	0,57	0,38
Chrysophanol	0,95	0,07
Helminthosporin	0,95	0,05
Uredinorubellin I	0,93	0,08
Uredinorubellin II	0,93	0,12
Ure_4	0,92	0,12
Ure_5	0,90	0,17

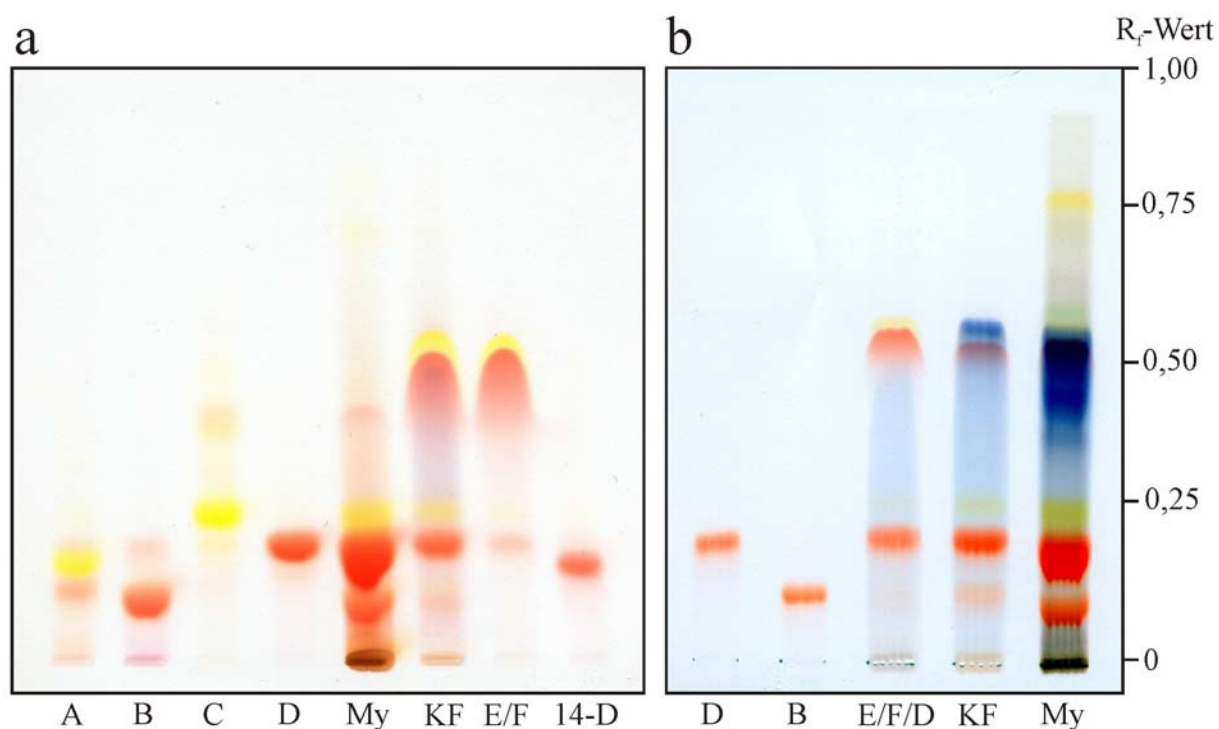


Abbildung 3.2: DC (RP-18, LM B₁) der isolierten Verbindungen Rubellin A (A), Rubellin B (B), Rubellin C (C), Rubellin D (D), Rubellin E (E), Rubellin F (F) und 14-Dehydrorubellin D (14-D) im Vergleich mit Ethylacetat-Extrakten von Kulturfiltrat (KF) und Mycel (My) verschiedener Kultivierungen (a: Czapek-Thom-Medium, b: Phosphatpuffer-Medium).

Tabelle 3.2: HPLC-Daten der isolierten Verbindungen (*ret. time*, [min]).

Verbindung	Analytische HPLC				Semipräp. HPLC		Präparative HPLC		
	Kalibrier- gerade	LM D ₂ (0,6 ml/min)	LM D ₄ (0,6 ml/min)	LM D ₄ + 0,25% HCOOH (0,6 ml/min)	LM D ₂ (5 ml/min)	LM D ₃ (5 ml/min)	LM D ₁ (6,5 ml/min)	LM D ₂ (8 ml/min)	LM D ₅ (8 ml/min)
	(R ²)	<i>ret. time</i>	<i>ret. time</i>	<i>ret. time</i>	<i>ret. time</i>	<i>ret. time</i>	<i>ret. time</i>	<i>ret. time</i>	<i>ret. time</i>
Rubellin A	37072x (0,9998)	10,8	18,4	18,5	17,8	20,8	27,0	25,6	9,7
Rubellin B	49020x (0,9996)	14,2	19,3	19,5	23,4	22,2	34,8	34,3	10,4
Rubellin C	35665x (0,9978)	7,0	15,5	15,6	11,4	17,8	17,9	16,0	7,9
Rubellin D	48456x (0,9977)	8,0	16,6	16,7	13,1	18,9	20,5	18,5	8,2
14-Dehydro- rubellin D	34778x (0,9922)	9,3	17,9	18,0	15,6	20,0	24,5	21,9	8,5
Rubellin E	44665x (0,9999)	5,9	5,5	-	9,9	9,5	-	13,8	-
Rubellin F	32843x (0,9999)	5,3	4,5	-	8,9	7,4	-	12,5	-
Caeruleo- ramularin I	27529x (0,9999)	7,8	3,1	14,7	-	-	16,8	-	-
Caeruleo- ramularin II	-	7,7	3,0	12,7	-	-	14,3	-	-
Chryso- phanol	81590x (0,9992)	19,4	20,5	20,7	-	-	51,3	46,3	14,9
Helmintho- sporin	51285x (0,9999)	27,1	22,3	22,5	-	-	75,1	67,7	17,9
Uredino- rubellin I	29299x (0,9993)	15,8	19,7	19,9	-	-	37,3	35,6	-
Uredino- rubellin II	19091x (0,9996)	13,6	19,1	19,2	-	-	31,8	31,2	-
Ure_4	-	12,0	18,7	18,8	-	-	28,4	27,0	-
Ure_5	-	8,6	17,1	17,3	-	-	20,8	19,7	-

3.2.2 Spektroskopische Untersuchungen

UV/Vis-Spektroskopie

Alle isolierten Verbindungen absorbieren Licht sowohl im sichtbaren als auch im ultravioletten Bereich. Drei Substanzgruppen bzw. Grundtypen lassen sich anhand ihres UV/Vis-Spektrums gut voneinander unterscheiden. Die in Abbildung 3.3 dargestellten Spektren sind typisch für diese drei Gruppen, wobei das chromophore Grundsystem der Gruppen sehr ähnlich ist. Die gelb gefärbten Verbindungen, zu denen Rubellin A, C, F, Uredinorubellin II und Chrysophanol gehören, stellen eine Gruppe (Abbildung 3.3a) dar. Sie unterscheiden sich im Chromophor von der zweiten Gruppe (Abbildung 3.3b), den „roten“ Verbindungen (Rubellin B, D, E, Uredinorubellin I bzw. Helminthosporin), nur durch das Vorhandensein einer OH-Gruppe in Position C-4 (Vergleich Abbildung 3.15). Dahingegen absorbieren die Verbindungen Caeruleoramularin I und II Licht im längerwelligen Bereich und können in einer dritten Gruppe zusammengefasst werden (Abbildung 3.3c - d). Die molaren Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 3.3 aufgeführt. Hervorzuheben ist die hypsochrome Verschiebung von Caeruleoramularin I und II nach Zugabe von HCOOH (1 %).

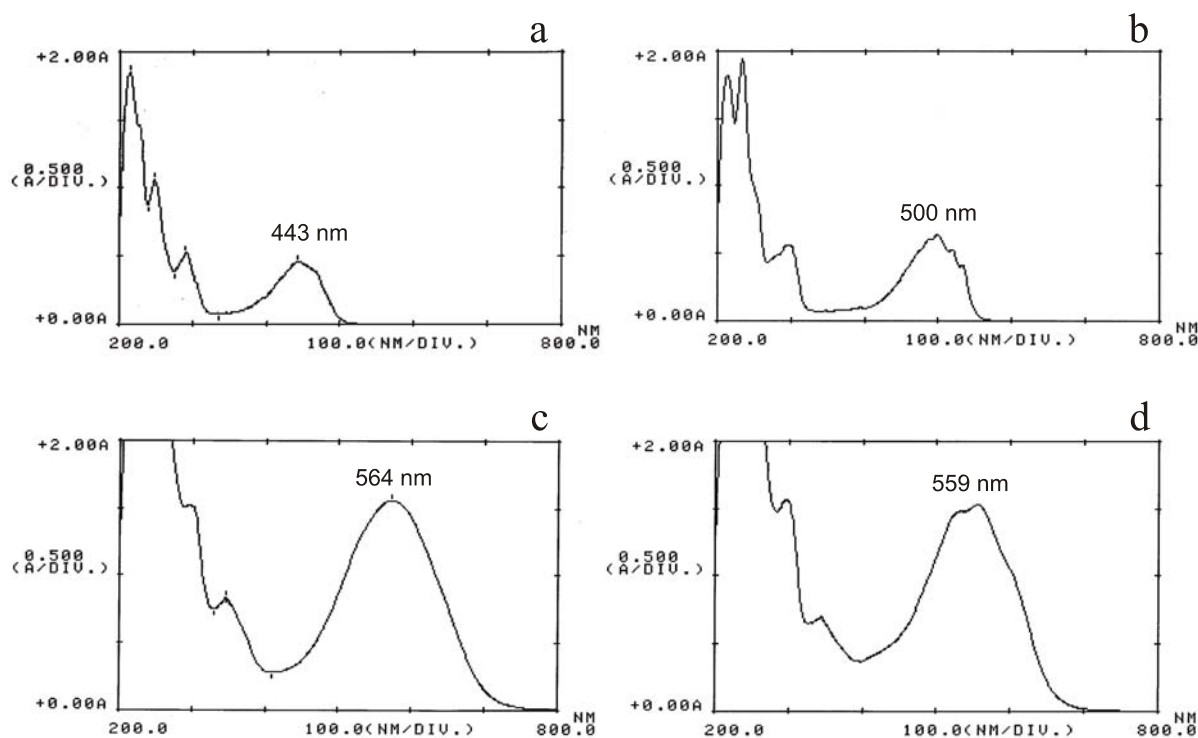


Abbildung 3.3: UV/Vis-Spektrum von Rubellin C (a), Rubellin D (b) und Caeruleoramularin I (c, d). Die hypsochrome Verschiebung λ_{\max} von Caeruleoramularin I nach Ansäuerung mit 1 % HCOOH ist im Spektrum d) dargestellt (c = 20 $\mu\text{g/ml}$ in Methanol bei 20 °C).

Tabelle 3.3: Absorptionsmaxima und molare Extinktionskoeffizienten der isolierten Verbindungen (in MeOH).

Verbindung	UV λ nm (log ϵ)				
Rubellin A	214 (4,69)	252 (4,43)	443 (4,08)		
Rubellin B	235 (4,74)	499 (4,25)	519 (4,17)	533 (4,06)	
Rubellin C	214 (4,80)	248 (4,46)	292 (4,16)	443 (4,08)	
Rubellin D	213 (4,78)	235 (4,71)	499 (4,20)	519 (4,12)	533 (4,01)
14-Dehydrorubellin D	214 (4,75)	233 (4,65)	500 (4,11)	519 (4,01)	534 (3,92)
Rubellin E	215 (4,59)	490 (3,96)	501 (3,97)	522 (3,92)	591 (3,07)
Rubellin F	215 (4,87)	251 (4,53)	449 (4,11)		
Caeruleoramularin I	225 (4,29)	302 (3,80)	564 (3,86)		
mit 1 % HCOOH	214	302 (3,93)	559 (3,93)		
Caeruleoramularin II	213	255	346 (3,50)	577 (3,67)	
mit 1 % HCOOH	258 (4,51)	298 (3,96)	346 (3,60)	556 (3,89)	
Chrysophanol	224 (4,73)	256 (4,49)	429 (4,14)		
Helminthosporin	230 (4,53)	254 (4,21)	287 (3,80)	488 (3,94)	
Uredinorubellin I	233 (4,68)	255 (4,32)	272 (4,25)	339 (3,75)	499 (4,13)
Uredinorubellin II	227 (4,51)	253 (4,22)	338 (3,55)	440 (3,83)	
Ure_4*	232	257	337	470	500
Ure_5*	213	228	250	290	442

*zu geringe Substanzmenge bzw. instabile Verbindung

Polarimetrie

Aufgrund mehrerer asymmetrischer Kohlenstoffatome und der damit vorhandenen Chiralitätszentren im Molekül sind die beschriebenen Substanzen optisch aktiv. Auffallend sind die hohen optischen Drehwerte von Rubellin E und 14-Dehydrorubellin D (Tabelle 3.4). Hierbei könnte die frei drehbare Bindung zwischen C-16 und C-18 eine Rolle spielen (siehe auch Abbildung 3.15). Hingegen sind die Verbindungen mit dem 7-gliedrigen Lactonring (Rubellin A und B) in ihrer Struktur eher rigide. Auffallend sind auch die geringen Unterschiede der Drehwinkel von Rubellin A und C. Rubellin B und D besitzen interessanterweise einen identischen spezifischen Drehwinkel.

Tabelle 3.4: Spezifische optische Drehwinkel der Rubelline A - E und 14-Dehydrorubellin D.

Verbindung	spezifische Drehung bei $\lambda = 589 \text{ nm}$	c [g/100ml]	Lösungsmittel
Rubellin A	+310°	0,1	Methanol
Rubellin B	+350°	0,1	Methanol
Rubellin C	+220°	0,1	Methanol
Rubellin D	+350°	0,1	Methanol
14-Dehydrorubellin D	+1600°	0,01	Methanol
Rubellin E	+2800°	0,01	Methanol

Massenspektrometrie

Mittels *Peak-Matching*-Methode konnten über HR-MS unter Verwendung entsprechender Vergleichssubstanzen die genauen molekularen Massen der isolierten Verbindungen bestimmt und damit ihre entsprechenden Summenformeln errechnet werden (Tabelle 3.5). Allen Summenformeln, außer den beiden Verbindungen Chrysophanol und Helminthosporin, liegen 30 Kohlenstoffatome pro Molekül zugrunde und unterscheiden sich um bis zu drei Sauerstoff- bzw. vier Wasserstoffatome. Somit handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um strukturell ähnliche Verbindungen.

Tabelle 3.5: Molekulare Massen der isolierten Verbindungen mit entsprechenden Summenformeln (angegeben sind jeweils die theoretische und die gemessene molekulare Masse [m/z]).

Verbindung	[M-H ⁺]	[M-H ⁺]	Summenformel [M-H ⁺]		
	theoretischer Wert	Messwert	C	H	O
Rubellin A	525,1186	525,1193	30	21	9
Rubellin B	541,1135	541,1158	30	21	10
Rubellin C	525,1186	525,1188	30	21	9
Rubellin D	541,1135	541,1154	30	21	10
Rubellin E	559,1240	559,1213	30	23	11
Rubellin F	543,1291	543,1271	30	23	10
14-Dehydrorubellin D	539,0978	539,1002	30	19	10
Caeruleoramularin I	525,1186	525,1150	30	21	9
Caeruleoramularin II	525,1186	525,1156	30	21	9
Chrysophanol	253,0501	253,0489	15	9	4
Helminthosporin	269,0450	269,0458	15	9	5
Uredinorubellin I	541,1135	541,1110	30	21	10
Uredinorubellin II	525,1180	525,1185	30	21	9
Ure_4	539,0978	539,0968	30	19	10
Ure_5	523,1029	523,1024	30	19	9

IR-Spektroskopie

In der IR-Spektroskopie werden die Moleküle über Infrarotstrahlung zu spezifischen Valenz- und Deformationsschwingungen angeregt. Es lassen sich aus den Spektren Aussagen zu funktionellen Gruppen oder auch Teilstrukturen ableiten. Da es sich bei den Verbindungen nach den physiko-chemischen Daten um strukturell verwandte Stoffe handelt, weisen auch die IR-Spektren nur geringe Unterschiede auf. Interessant ist der so genannte *Fingerprint*-Bereich zwischen 1500 und 1800 cm^{-1} . Am Beispiel der in Abbildung 3.4 dargestellten Teilspektren der „roten“ Verbindungen (an Position C-4 mit OH-Gruppe) wird deutlich, dass im Bereich der C-O-Valenzschwingung (Lactonstruktur) um 1730 cm^{-1} im Falle der Verbindungen Rubellin E und Uredinorubellin I keine Bande detektierbar ist und somit die zu erwartende Lactonstruktur bei diesen beiden Stoffen offensichtlich fehlt. Für die hier nicht dargestellten „gelben“ Verbindungen (Werte siehe Anhang A.III) konnten die gleichen Zusammenhänge festgestellt werden.

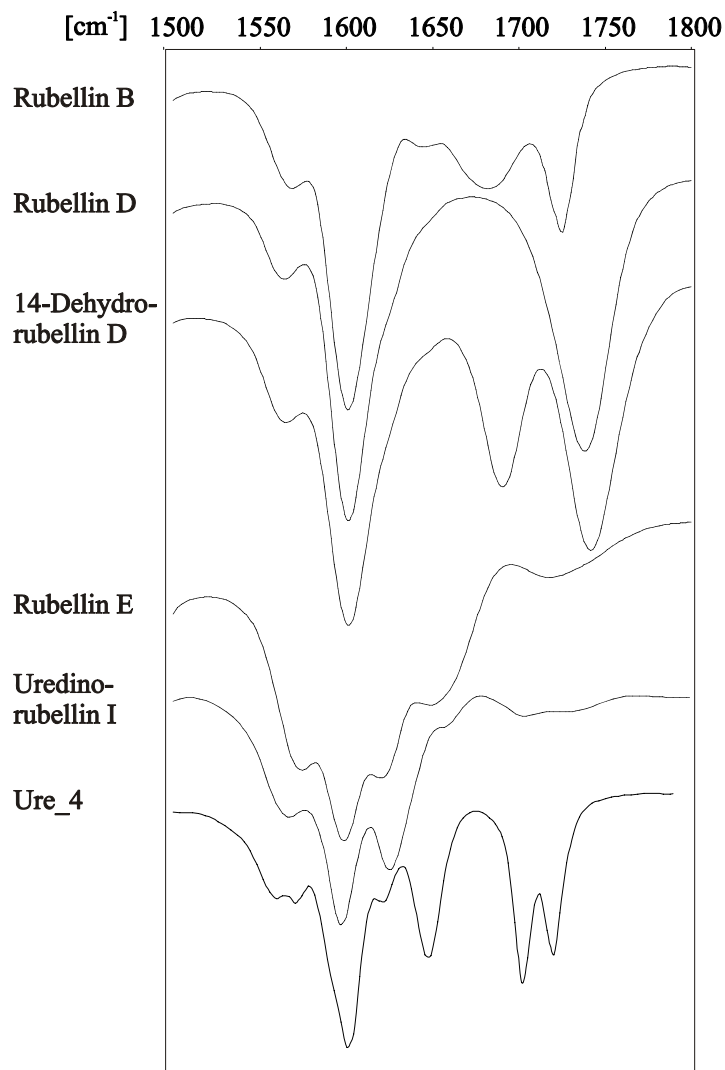


Abbildung 3.4: Ausgewählte IR-Teilspektren der „roten“ Verbindungen Rubellin B, D, E, 14-Dehydrorubellin D und Uredinorubellin I, sowie von Ure_4.

NMR-Spektroskopie

In den Tabellen 3.6 - 3.11 sind die NMR-Daten der isolierten Verbindungen aufgeführt. Sie wurden in Tetrahydrofuran- d_8 (Rubellin A, B, D, 14-Dehydrorubellin D, sowie Uredinorubellin I und II), Acetonitril- d_3 (Rubellin C), Dimethylsulfoxid- d_6 (Caeruleoramularin I, Ure_4 und Ure_5), sowie in Chloroform- d_1 (Chrysophanol und Helminthosporin) aufgenommen. Die Zuordnung der Protonen erfolgte entsprechend der HSQC- bzw. DEPT90/135-Spektren. Ausgewählte 2D-NMR-Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.5 - 3.14 dargestellt (vollständige Kopplungsdaten im Anhang A.II, Tabelle A.1 - A.8). Die Nummerierung der C-Atome für alle isolierten Verbindungen wurden aus Arnone et al. (1986, 1989) übernommen, mit Ausnahme der beiden Anthrachinone Chrysophanol und Helminthosporin, die nach Danielsen et al. (1992) bzw. Fokou (2006) nummeriert wurden. Zum besseren Verständnis wurden alle NMR-Daten in das nachfolgende Kapitel 3.2.3 integriert.

3.2.3 Zusammenfassende Diskussion zur Strukturaufklärung

Rubelline A - D

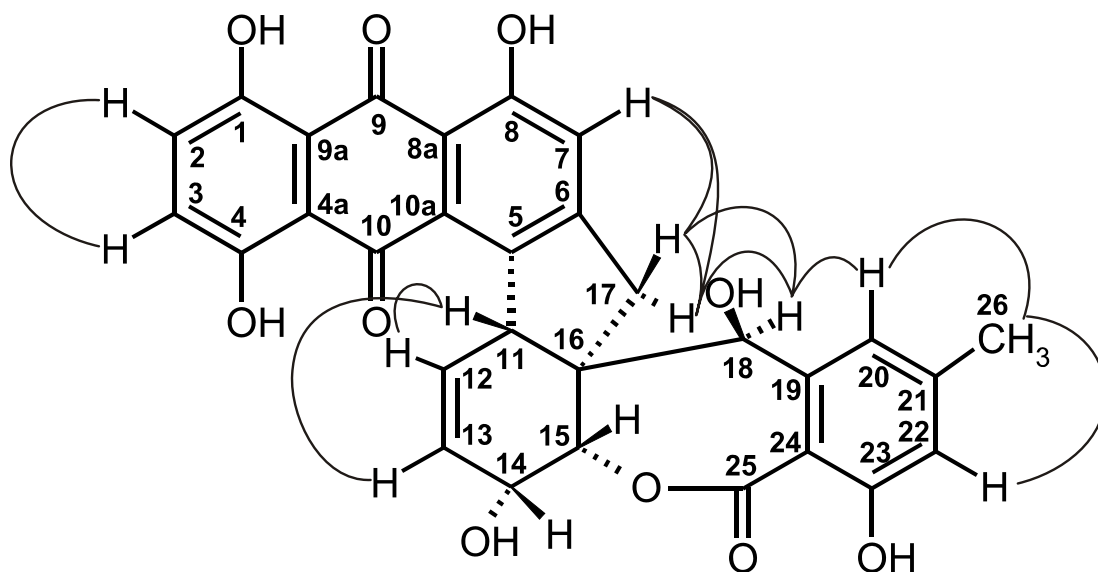
Es konnten über das oben genannte Isolierungsschema (Kapitel 3.1, Abbildung 3.1) zunächst vier Verbindungen gewonnen werden. Die Bestimmung der molekularen Massen von 526 bzw. 542 Da und die daraus resultierenden Summenformeln (Tabelle 3.5) verbundenen mit der ^{13}C - bzw. ^1H -NMR ergaben eine hohe Übereinstimmung mit den von Arnone et al. (1986, 1989) beschriebenen Anthrachinon-Derivaten. Diese Vermutung erhärtete sich nach UV/Vis- und IR-Spektroskopie. Bestätigung konnte abschließend über weitere 2D-NMR-Messungen (HMBC, DEPT, COSY, NOESY und TOCSY) erlangt werden. Es handelt sich um Anthrachinon-Derivate, welche bereits aus dem phytopathogenen Pilz *Mycosphaerella rubella* NIESSL isoliert werden konnten. Die bei den ^{13}C - und ^1H -Verschiebungen im Vergleich zu Arnone et al. (1986, 1989) auftretenden Differenzen beruhen auf Unterschieden hinsichtlich der verwendeten deuterierten Lösungsmittel (Tetrahydrofuran und Acetonitril).

Im Folgenden werden wichtige strukturbeschreibende 2D-NMR-Kopplungen zur Unterscheidung der vier Verbindungen beschrieben. Im Bereich der chinoiden Grundstruktur im oberen Teil des Moleküls lassen sich zwei Grundtypen unterscheiden. Zum einen die „gelben“ Verbindungen ($\lambda_{\text{max}}=443\text{ nm}$) und zum anderen die „roten“ Verbindungen ($\lambda_{\text{max}}=500\text{ nm}$). Während die Verbindungen Rubellin A und C (gelb) in Position C-4 über ein kovalent gebundenes Proton verfügen, sind die „roten“ durch eine OH-Gruppe in gleicher Position gekennzeichnet. Es handelt sich somit um ein so genanntes ABX-Spinsystem mit drei

benachbarten Protonen im A-Ring (Rubellin A und C) und um ein AB-Spinsystem durch zwei *ortho*-ständige aromatische Protonen in den Positionen C-2 und C-3 bei den „roten“ Verbindungen Rubellin B bzw. D. Charakteristisch für alle vier Verbindungen sind u. a. zwei *meta*-koppelnde aromatische Protonen in den Positionen C-20 bzw. C-22, welche mit der benachbarten Methyl-Gruppe im COSY-Spektrum *cross peaks* zeigen (Abbildung 3.5, 3.7 und 3.8), und zwei geminal koppelnde Protonen einer CH₂-Gruppe an Position C-17. Im unteren Teil des Moleküls werden wieder zwei verschiedene Grundstrukturen deutlich. Auf der einen Seite Rubellin A und B mit einem 7-gliedrigem (Abbildung 3.5), Rubellin C und D hingegen mit einem jeweils 5-gliedrigen Lactonring (Abbildung 3.7). Die jeweiligen Ergebnisse der HSQC-Spektren und die daraus ersichtliche Zuordnung von Protonen zu den direkt gebundenen Kohlenstoffatomen sowie die DEPT-Spektren sind in den Tabellen 3.6 und 3.7 dargestellt.

Eine Umwandlung von Rubellin B zu D bzw. Rubellin A zu C konnte nach Behandlung mit 3 N Ammoniak (12 h) und anschließender Neutralisation mit HCl *via* analytische HPLC nachgewiesen werden. Diese Umesterung verdeutlicht zunächst die strukturelle Verwandtschaft der Verbindungen und legt intra- bzw. extrazelluläre nicht-enzymatische Umwandlungsprozesse während der Fermentation nahe. Diese Reaktion ist allerdings nicht reversibel. Offensichtlich ist also der 5-gliedrige Lactonring stabiler als der 7-gliedrige. Da die Existenz von Zwischenverbindungen mit geöffneten Lactonring als wahrscheinlich anzunehmen ist, wurde mit modifizierten Extraktionsbedingungen gezielt danach gesucht. Zwei der möglichen Intermediate konnten aus dem lyophilisierten Kulturfiltrat mittels erschöpfender MeOH-Extraktion isoliert werden (Rubellin E und F).

Aufgrund der hohen Übereinstimmung der NMR-Daten wurden die stereochemischen Darstellungen aller weiteren Verbindungen aus denen von Arnone et al. (1986, 1989) übernommen.



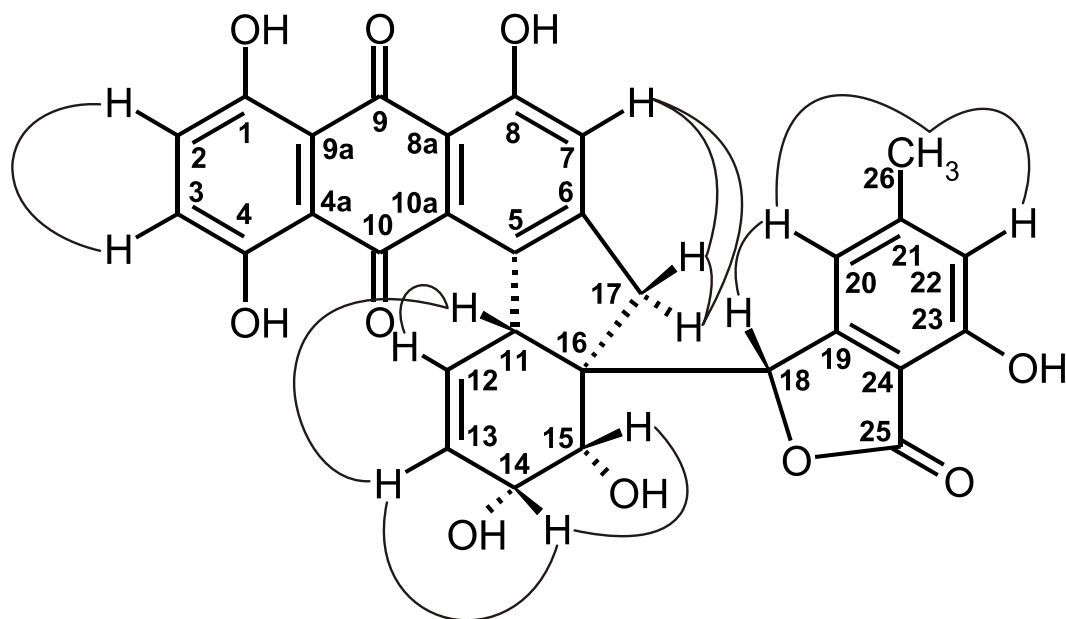


Abbildung 3.7: Strukturformel von Rubellin D. Eingezeichnet sind die entsprechenden ^1H - ^1H -Kopplungsmuster eines COSY-dqf-Spektrums.

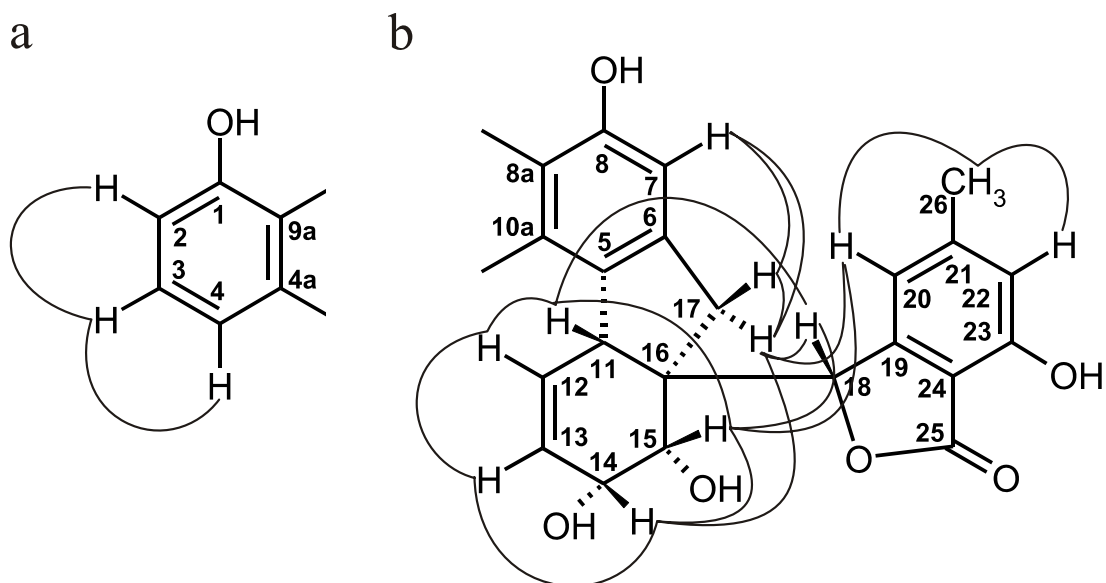


Abbildung 3.8: Ausschnitte der Strukturformel von Rubellin C bzw. Rubellin D. Dargestellt sind ^1H - ^1H -Kopplungsmuster eines TOCSY-Spektrums (a, Rubellin C) und ^1H - ^1H -Kopplungsmuster eines NOESY-Spektrums (b, Rubellin C bzw. D).

Tabelle 3.6: ^{13}C - und ^1H -Verschiebungen [ppm] von Rubellin A bzw. Rubellin B (gemessen in Tetrahydrofuran- d_8 , 30 °C).

C-Atom	Rubellin A		Rubellin B		DEPT
	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]	
1	162,13	-	156,96	-	C
2	123,47	7,29	128,74	7,32	CH
3	136,47	7,73	129,03	7,31	CH
4	119,10	7,79	157,90	-	CH/C
4a	134,35	-	113,41	-	C
5	141,94	-	142,09	-	C
6	157,97	-	157,84	-	C
7	119,01	7,15	119,41	7,17	CH
8	163,25	-	163,66	-	C
8a	113,56	-	113,60	-	C
9	192,61	-	190,68	-	C
9a	115,96	-	112,72	-	C
10	182,62	-	188,39	-	C
10a	125,48	-	125,56	-	C
11	48,13	4,68	48,39	4,73	CH
12	128,67	5,73	128,47	5,76	CH
13	125,51	5,67	125,76	5,71	CH
14	65,23	4,39	65,19	4,39	CH
15	81,64	4,43	81,56	4,41	CH
16	53,53	-	53,56	-	C
17	39,62	4,99/3,02	39,52	5,01/3,04	CH ₂
18	78,63	4,97	78,58	4,98	CH
19	143,16	-	143,11	-	C
20	116,43	7,01	116,45	7,02	CH
21	145,56	-	145,58	-	C
22	117,55	6,77	117,54	6,76	CH
23	160,13	-	160,14	-	C
24	109,12	-	109,12	-	C
25	172,51	-	172,48	-	C
26	21,03	2,35	21,04	2,27	CH ₃

Tabelle 3.7: ^{13}C - und ^1H -Verschiebungen [ppm] von Rubellin C (gemessen in Acetonitril- d_3 , 65 °C), sowie Rubellin D und 14-Dehydrorubellin D (gemessen in Tetrahydrofuran- d_8 , 30 °C).

C-Atom	Rubellin C		Rubellin D		14-Dehydrorubellin D		DEPT
	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]	
1	163,23	-	158,07	-	158,30	-	C
2	125,13	7,71	129,85	7,29	130,29	7,33	CH
3	138,41	7,28	130,15	7,29	130,43	7,33	CH
4	120,63	7,71	158,96	-	159,14	-	CH/C
4a	135,40	-	114,19	-	114,04	-	C
5	141,66	-	141,96	-	139,20	-	C
6	157,82	-	157,86	-	157,87	-	C
7	121,08	7,18	121,04	7,19	121,62	7,29	CH
8	164,59	-	164,83	-	164,96	-	C
8a	115,55	-	114,94	-	115,60	-	C
9	193,90	-	191,70	-	191,67	-	C
9a	117,24	-	113,64	-	113,50	-	C
10	184,40	-	189,09	-	188,93	-	C
10a	128,13	-	127,49	-	127,89	-	C
11	48,77	4,20	48,49	4,26	48,12	4,57	CH
12	129,25	5,69	128,84	5,70	146,36	6,71	CH
13	127,06	5,76	126,94	5,70	125,57	5,92	CH
14	66,77	4,29	66,73	4,30	198,50	-	CH/C
15	69,34	4,26	69,07	4,30	74,03	4,85	CH
16	54,40	-	54,18	-	56,05	-	C
17	37,66	4,26/3,15	38,10	4,49/3,14	38,84	3,42/3,12	CH ₂
18	87,81	5,73	87,14	5,70	85,86	5,71	CH
19	149,74	-	149,26	-	148,73	-	C
20	117,39	6,99	116,99	6,99	116,82	7,00	CH
21	149,55	-	148,13	-	148,38	-	C
22	117,95	6,74	117,63	6,68	118,26	6,74	CH
23	157,26	-	157,58	-	155,94	-	C
24	111,06	-	111,20	-	110,99	-	C
25	171,18	-	169,77	-	169,18	-	C
26	22,50	2,37	22,20	2,38	22,18	2,41	CH ₃

14-Dehydrorubellin D

Aus Mycel- und Kulturfiltrat-Extrakten von *R. collo-cygni* konnte eine weitere Minor-komponente isoliert und später auch in *R. uredinicola* nachgewiesen werden. Es handelt sich um eine Verbindung, deren Molekulargewicht (Tabelle 3.5) von denen der bekannten Verbindungen Rubellin D bzw. B um genau 2 Da abweicht. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich um ein Dehydro-Derivat handeln könnte. Das unveränderte Chromophor mit einem Absorptionsmaximum bei 500 nm grenzt die mögliche Dehydrierung auf die untere Molekül-Struktur ein. Die Resultate der DEPT- und HSQC-Spektren sind in Tabelle 3.7, die HMBC-Korrelationen in der Abbildung 3.9 dargestellt. Nach selektiver TOCSY-Anregung des α -Protons an Position C-17 wurden Kopplungen zu den Protonen an C-7, C-11, C-18 und C-15 sichtbar, nicht jedoch zur Position C-14 (Abbildung 3.10). Weitere homonukleare 2D-NMR-Methoden (COSY und NOESY) bestätigten dieses Ergebnis. Im Vergleich zu Rubellin D fällt ein neues Carbonylsignal ($\delta_C = 198,5$ ppm) im Bereich der C-Atome 12 bis 15 auf. Die 2D-NMR-Messungen bestätigen die Struktur von 14-Dehydrorubellin D. Die phenolischen Hydroxylgruppen zeigen ein nicht aufgelöstes gemeinsames Signal bei δ_H 12,8.

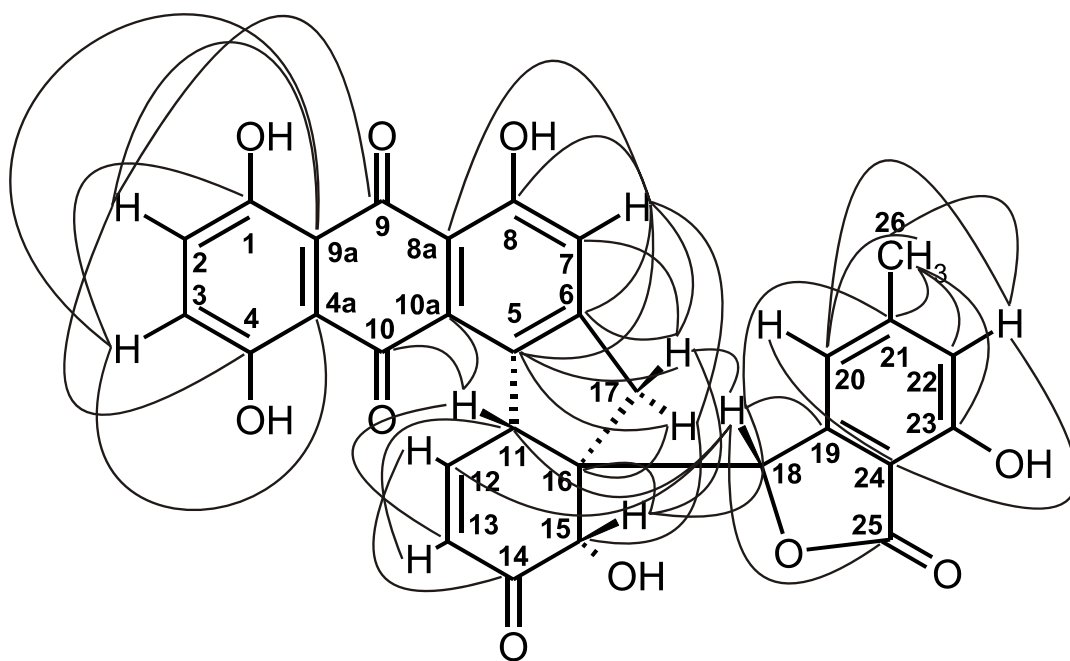


Abbildung 3.9: Strukturformel von 14-Dehydrorubellin D. Dargestellt sind die ^{13}C - ^1H -Kopplungsmuster eines HMBC-Spektrums.

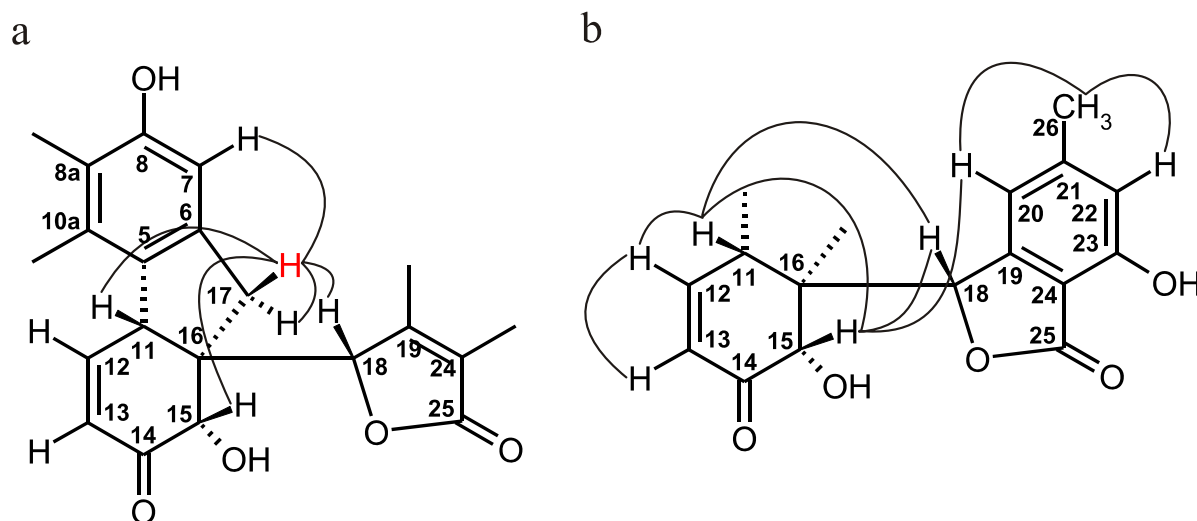


Abbildung 3.10: Ausschnitte der Strukturformel von 14-Dehydrorubellin D. Dargestellt sind ^1H - ^1H -Kopplungsmuster nach selektiver Anregung (selektives TOCSY) eines Protons (rot) am C-17-Atom (α) eines COSY-dqf-Spektrums (a) und ^1H - ^1H -Kopplungsmuster eines NOESY-Spektrums (b).

Rubelline E und F

Zwei relativ polare Verbindungen konnten nur durch ein modifiziertes Aufarbeitungsschema isoliert werden. Hierfür wurde das Kulturfiltrat lyophilisiert und anschließend mit MeOH erschöpfend extrahiert (Abbildung 3.1). Beide Verbindungen konnten jedoch weder im Mycel von *R. collo-cygni* noch in der hyperparasitären Art *R. uredinicola* nachgewiesen werden. In Anlehnung an die bei Arnone et al. (1986, 1989) beschriebenen Verbindungen wurden die beiden Strukturen als Rubellin E und F bezeichnet.

Für die rot gefärbte Verbindung, die ein ähnliches UV/Vis-Spektrum wie Rubellin D bzw. B aufweist, konnte ein Molekulargewicht von 560 Da ermittelt werden. Dieses unterscheidet sich somit von den bisher bekannten „roten“ Verbindungen um 18 Da. Diese Tatsache in Kombination mit der fehlenden, für die bekannten Rubelline jedoch typischen Lactonbande bei 1735 cm^{-1} (Abbildung 3.4) lässt den Schluss zu, dass es sich um eine offene Form des Lactonringes handelt. In Position C-25 sollte sich somit eine Carboxylgruppe befinden. Auffällig ist auch die hohe optische Rotation von $+2800^\circ$, die vermutlich auf die neu entstandenen Chiralitätszentren zurückzuführen ist. Aufgrund der unzureichenden Stabilität waren NMR-Analysen leider nicht möglich. Jedoch konnte durch Säurekatalyse eine aktive Umwandlung von Rubellin E zu Rubellin D induziert werden. Durch den gesicherten

strukturellen Nachweis des entstandenen Anthrachinons Rubellin D (mit HPLC, MS und NMR) sowie die erhobenen physiko-chemischen Eigenschaften von Rubellin E (Molekulargewicht, UV/Vis, IR und MS) kann deren Struktur als gesichert angesehen werden.

Im Zusammenhang mit der Isolation von Rubellin E wurde eine weitere Substanz in relativ geringen Mengen gewonnen. Ein Molekulargewicht von 544 Da, ein Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\text{max}} = 449 \text{ nm}$ und das chromatographische Verhalten (Tabelle 3.5 und 3.2) deuten ebenfalls auf eine Struktur mit geöffnetem Lactonring hin. Gestützt wird diese Vermutung durch analoge Versuche zur säurekatalysierten Umsetzung, wobei in diesem Falle Rubellin C gebildet wurde. Durch die vergleichbare Überführung in die 5-gliedrige Lactonstruktur und die fehlende Lacton-Valenzschwingung im IR-Spektrum der nativen Verbindung kann die postulierte Strukturformel (Kapitel 3.3, Abbildung 3.15) trotz fehlender NMR-Messungen als weitgehend gesichert angesehen werden.

Da diese Substanzen nur im Kulturfiltrat nachgewiesen werden konnten, ist es denkbar, dass es sich hierbei um Intermediate bei der extrazellulären Konversion der 7-gliedrigen zu 5-gliedrigen Lacton-Metaboliten handelt. Abschließend kann bemerkt werden, dass es sich bei Rubellin E und F nicht um Artefakte der bekannten Rubelline handelt, da letztere einerseits unter Isolierungsbedingungen stabil sind und andererseits die „offenen“ Lactone direkt mit DC aus dem Kulturfiltrat ohne Aufarbeitung mit EtOAc nachweisbar sind.

Caeruleoramularin I

Bei den Untersuchungen zur Biosynthese der Verbindungen wurde zur Stabilisierung und der Erhöhung der Produktausbeute von Rubellin B ein Zusatz des Phosphatpuffers (pH 5,4) nach Sörensen zum Medium vorgenommen. Aufgrund dieser Veränderung wurden offensichtlich auch die Ausbeuten der blau gefärbten Verbindungen (UV/Vis-Daten Tabelle 3.3 und Abbildung 3.3) erhöht. In Fermentationen ohne Phosphatpuffer konnten diese Verbindungen nur in geringen Mengen nachgewiesen werden (Kapitel 3.6, Tabelle 3.12).

Es konnten zwei blau gefärbte Verbindungen mit der molekularen Masse von 526 Da bzw. einer Summenformel von $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{O}_9$ isoliert werden. Obwohl das Molekulargewicht identisch mit denen der „gelben“ Verbindungen Rubellin A und C ist, wurde eine Änderung des Absorptionsmaximums von 443 nm auf 564 nm beobachtet. Aufgrund dessen sind die beiden neuen Substanzen mit Caeruleoramularin I und II bezeichnet worden. Nach Zugabe von NaOH konnte sogar eine bathochrome Verschiebung bis auf 593 nm beobachtet werden. Nach Ansäuerung mit 1 % HCOOH war jedoch eine schwach hypsochrome Verschiebung von 564

auf 559 nm festzustellen. Die IR-Spektren zeigen im *Fingerprint*-Bereich (siehe Anhang A.III) ähnliche Valenz- bzw. Deformationsschwingungen wie die bekannten Stoffe (Rubellin A - D). Die Stabilität der Verbindungen ist jedoch nur in Konzentrationen < 2 mg/ml gewährleistet. Bei höheren Konzentrationen finden Umwandlungsprozesse statt und es entsteht ein in den gängigen Lösungsmitteln unlösliches Polymer. Die Messung von NMR-Signalen in solch niedrigen Konzentrationen ist nahezu unmöglich. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurden deshalb unterschiedlich markierte Vorstufen (Acetat) zur Anreicherung des ^{13}C -Gehaltes (von nativ 1,1 % auf etwa 20 %) gefüttert, unter der Annahme, dass Caeruleoramularin I bzw. II auf gleichem biosynthetischem Wege wie die Rubelline gebildet werden. Entscheidend war hierbei die Fütterung von zwei verschieden markierten ^{13}C -Acetat-Vorstufen ([1- ^{13}C]- und [2- ^{13}C]-markiert), um Satelliten-Kopplungen im ^{13}C -Spektrum gering zu halten. Dadurch waren sowohl ^1H -, ^{13}C -, DEPT-, HSQC-NMR-Messungen (Tabelle 3.8) als auch die Aufnahme von 2D-NMR-Spektren von Caeruleoramularin I möglich (siehe Anhang Tabelle A. 6). Über heteronukleare Kopplungen im HMBC bzw. homonukleare Protonen-Kopplungen im COSY- und NOESY-Spektrum konnte der untere Teil des Moleküls jedoch als identisch zu Rubellin A bzw. B beschrieben werden (Abbildung 3.11). Die Unterschiede im oberen Teil des Moleküls werden durch die nachfolgend erläuterten 2D-NMR-Ergebnisse bestätigt. Aufgrund differierender Signale der benachbarten Protonen an C-2 (δ_{H} 7,23) bzw. C-3 (δ_{H} 7,07) konnten Kopplung im TOCSY-Spektrum beobachtet werden. Das Proton in Position C-2 zeigte im HMBC-Spektrum deutliche *cross peaks* zu C-3 (δ_{C} 140,7) und C-9a (δ_{C} 113,6), das C-3 Proton mit dem neuen Carbonylsignal C-4 (δ_{C} 183,8) und C-4a (δ_{C} 128,0). Ausgehend vom Proton in Position C-2 konnten weitere HMBC *cross peaks* beobachtet werden: C-7-H (δ_{H} 7,00) mit C-5 (δ_{C} 136,7), C-8 (δ_{C} 158,9) und C-16 (δ_{C} 53,0); C-11-H (δ_{H} 4,00) mit C-5 und C-6 (δ_{C} 136,7 bzw. δ_{C} 150,7) sowie weitere C-Atome im unteren Teil des Moleküls (Abbildung 3.11).

Eine wichtige Rolle im Strukturbeweis spielt das neue Proton in Position C-10 (δ_{H} 7,80). Entsprechende HMBC *cross peaks* mit C-4, C-5, C-8a und C10a (δ_{C} 183,8; 136,7; 107,7; 130,7), sowie schwache Signale zu C-4a and C-9 (δ_{C} 128,0 und 185,4) konnten nachgewiesen werden. Die homonuklearen Kopplungen (NOESY) des C-10 Protons (δ_{H} 7.80) mit den Protons am C-11 bzw. C-12 (δ_{H} 4.00 bzw. δ_{H} 5.60) im unteren Teil des Moleküls sichern eine Anthracen-9,4-dion-Struktur des Moleküls endgültig ab (Abbildung 3.11b).

Solche anthranoiden Strukturen wurden bisher kaum beschrieben. Fain et al. (2003, 2005, 2006) beschäftigten sich mit Tautomeren von verschiedenen Hydroxyanthrachinonen. Zwar wurden diese Verbindungen durch Fluoreszenzanregung, Elektroemission und Resonanz-

Raman-Spektroskopie sowie Transformationsanalysen (Methoden siehe Marzocchi et al., 1998) untersucht und somit die Existenz von Anthracendion-Tautomeren mit Carbonylgruppen in unterschiedlichen Ringen beschrieben, allerdings immer nur im Gemisch mit anderen Tautomeren. Als reine Naturstoffe wurden derartige Strukturen jedoch noch nicht isoliert. Weiterhin konnten bei Caeruleoramularin I, in Verbindung mit den auftretenden unlöslichen Rückständen, Spuren von Rubellin B, bei Caeruleoramularin II analog dazu Spuren von Rubellin D, *via* HPLC und Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Stabilitätsversuche mit Caeruleoramularin I belegten eine konzentrationsabhängige Umwandlung zu Rubellin B bzw. dem Polymer. Es konnten hierbei 0,5 mg Rubellin B ausgehend von 1,5 mg eingesetztem Caeruleoramularin I (bei 25 °C) nachgewiesen werden. Da der Unterschied zwischen Edukt und Produkt bezüglich des Molekulargewichtes 16 Da beträgt, handelt es sich offenbar um Oxidationsprozesse. Begasungsversuche mit Helium bzw. Sauerstoff zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich nicht um eine Oxidation durch Luftsauerstoff handelt, sondern um eine intermolekulare Disproportionierungsreaktion, bei der ein Molekül reduziert und ein weiteres oxidiert wird (Bredereck et al., 1977; Quast & Fuchsbauer, 1986). Damit wäre auch die Entstehung des Polymerisates zu erklären. Caeruleoramularin II konnte aufgrund zu geringer isolierter Substanzmenge aus den Fütterungsversuchen mit ¹³C-Isotopen nicht mit NMR strukturell aufgeklärt werden. Aufgrund der oben erwähnten partiellen Umwandlung zu Rubellin D (analog Caeruleoramularin I zu Rubellin B) konnte jedoch ein Strukturvorschlag entwickelt werden (Abbildung 3.15).

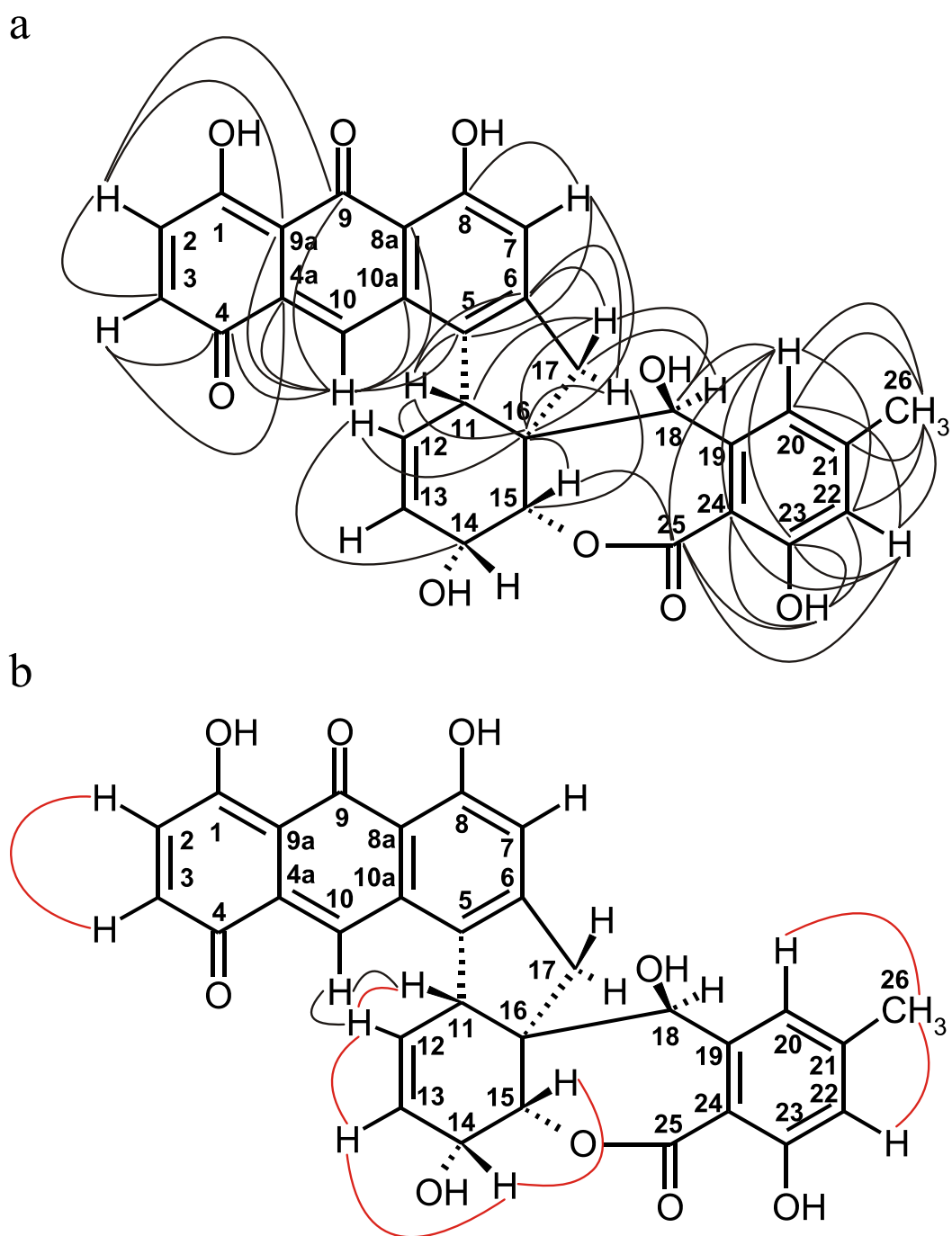


Abbildung 3.11: Strukturformel von Caeruleoramularin I. Dargestellt sind ¹³C-¹H-Kopplungsmuster eines HMBC-Spektrums (a), sowie in b) die entsprechenden ¹H-¹H-Kopplungsmuster des COSY-dqf- (rot) und ausgewählte Kopplungen des NOESY-Spektrums (schwarz).

Tabelle 3.8: ^{13}C - und ^1H -Verschiebungen [ppm] von Caeruleoramularin I (gemessen in Dimethylsulfoxid- d_6 , 25 °C).

Caeruleoramularin I			
C-Atom	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]	DEPT
1	169,42	-	C
2	140,38	7,23	CH
3	140,65	7,07	CH
4	183,81	-	C
4a	128,01	-	C
5	136,71	-	C
6	150,73	-	C
7	113,09	7,00	CH
8	158,91	-	C
8a	107,70	-	C
9	185,38	-	C
9a	113,63	-	C
10	119,30	7,80	CH
10a	130,72	-	C
11	45,62	4,00	CH
12	129,18	5,60	CH
13	126,25	5,60	CH
14	64,48	4,30	CH
15	79,87	4,19	CH
16	52,95	-	C
17	41,33	4,80/3,00	CH ₂
18	78,50	4,70	CH
19	142,16	-	C
20	116,72	6,83	CH
21	143,61	-	C
22	116,93	6,74	CH
23	157,20	-	C
24	111,97	-	C
25	168,59	-	C
26	22,01	2,30	CH ₃

Chrysophanol und Helminthosporin

Die beiden relativ unpolaren Verbindungen Chrysophanol und Helminthosporin unterscheiden sich massenspektrometrisch jeweils nur um 16 Da, also ein Sauerstoffatom. Sowohl UV/Vis- und MS- als auch ^{13}C - und ^1H -NMR-Daten (DEPT und HSQC, Tabelle 3.9) der gelb gefärbten Verbindung mit einem Molekulargewicht von 254 Da stimmen mit den Angaben von Danielsen et al. (1992) überein. Es handelt sich hierbei um die ubiquitär in der Tier- (Hilker & Schulz, 1991), Pflanzen- (Dagne & Steglich, 1984) und Pilzwelt (Van Eijk & Roeymans, 1981) vorkommende Verbindung Chrysophanol. Bei der zweiten Verbindung handelt es sich nach der Summenformel $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$ in Verbindung mit dem UV/Vis-Spektrum ($\lambda_{\text{max}} = 488\text{ nm}$) ebenfalls um ein Anthrachinon (Helminthosporin). Die weiteren ^1H - und ^{13}C -NMR-Messungen stimmen weitgehend mit den Literaturangaben von Fokou (2006) bzw. den Protonensignalen von Yagi et al. (1977) überein. Unstimmigkeiten gab es in der richtigen Zuordnung der ^{13}C -Verschiebungen in Position C-8 (133,26 ppm) bzw. C-10a (136,95 ppm). Diese aus Fokou (2006) bekannten Verschiebungswerte konnten aufgrund der Symmetrie des Anthrachinon-Grundmoleküls widerlegt werden. Aufgrund der identischen Verhältnisse um Position C-8 bzw. C-5 sollten auch die Verschiebungswerte ähnlich sein, analog dazu die Position C-10a und C-8a. Durch die Kopplungen im HMBC-Spektrum und im selektiven TOCSY (Anregung des Protons an der OH-Gruppe in Position C-8, Abbildung 3.12) ließen sich die Werte für C-8 auf 158,36 ppm und für C-10a auf 112,64 ppm korrigieren (Tabelle 3.9).

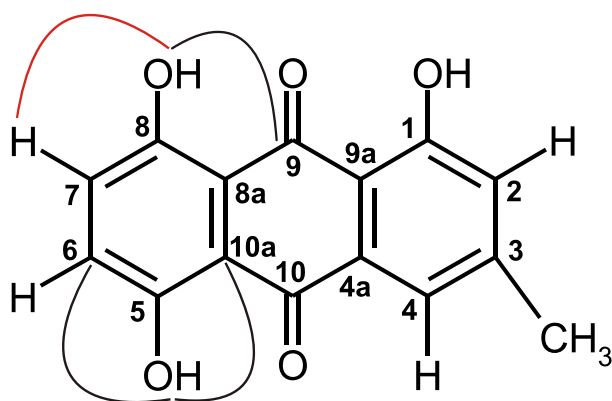


Abbildung 3.12: Strukturformel von Helminthosporin. Dargestellt sind ausgewählte ^{13}C - ^1H -Kopplungsmuster eines HMBC-Spektrums (schwarz), sowie die Kopplung nach selektiver Anregung von OH an C-8 (TOCSY-Spektrum, rot).

Tabelle 3.9: ^{13}C - und ^1H -Verschiebungen [ppm] von Chrysophanol bzw. Helminthosporin (gemessen in Chloroform- d_1 , 50 °C).

C-Atom	Chrysophanol		Helminthosporin		DEPT
	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]	
1	162,50	-	162,99	-	C
2	124,27	7,08	124,54	7,09	CH
3	149,26	-	149,10	-	C
4	121,25	7,27	120,79	7,68	CH
4a	133,43	-	133,40	-	C
5	119,83	7,79	157,71	-	CH/C
6	136,83	7,66	129,49	7,26	CH
7	124,45	7,25	129,63	7,27	CH
8	162,80	-	158,36	-	C
8a	115,96	-	112,91	-	C
9	192,59	-	190,72	-	C
9a	113,83	-	114,12	-	C
10	181,86	-	186,61	-	C
10a	133,78	-	112,64	-	C
Me	22,11	2,45	22,21	2,46	CH ₃
OH-1	-	11,94	-	12,06	-
OH-8	-	12,05	-	12,93	-
OH-5	-	-	-	12,24	-

Uredinorubellin I und II

Auf der Suche nach möglichen Intermediaten der Biosynthese wurden die Untersuchungen auf weitere Minorkomponenten im chromatographischen Umfeld der Rubelline ausgedehnt. Hierbei konnten zwei weitere Verbindungen aus einer Standkultur von *R. uredinicola* isoliert und später auch in *R. collo-cygni* nachgewiesen werden. Aufgrund der erstmaligen Isolation aus der hyperparasitären *Ramularia*-Art wurden sie als Uredinorubellin I und II bezeichnet. Schon die massenspektrometrische Untersuchung mit den daraus resultierenden Summenformeln von $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ (Uredinorubellin I) bzw. $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{O}_9$ (-16 Da, Uredinorubellin II), ließ eine Verwandtschaft zu den bisher beschriebenen Verbindungen vermuten. Dieser Verdacht erhärtete sich durch nachfolgende UV/Vis- bzw. IR-Messungen, wobei in letzterer Untersuchung analog zu den Rubellinen E und F keine Lacton-Valenzschwingung bei 1735 cm^{-1} (siehe Abbildung 3.4 und Anhang A.III) nachweisbar war.

^1H - und ^{13}C -NMR-Daten (DEPT und HSQC) sind in Tabelle 3.10 dargestellt. Im Vergleich zu den bekannten Rubellinen A und B werden Unterschiede nur im unteren Teil des Moleküls deutlich. Der 7-gliedrige Lactonring ist hier nicht vorhanden. Stattdessen befindet sich an

Position C-15 eine „neue“ Hydroxylgruppe. Es wird somit zu einem quarternären C-Atom. Dies wird durch folgende Ergebnisse gestützt. Die erhöhte chemische Verschiebung in Position C-25 von Uredinorubellin I (δ_C 202.8) und II (δ_C 202.9) belegt die Existenz einer neuen Carbonyl-Gruppierung. Die aus dem ^1H - ^1H -COSY-Spektrum erhaltenen *cross peaks* verbunden mit den *Longrange*-Kopplungen im NOESY-Spektrum (Abbildung 3.14) belegen eindeutig die strukturellen Gemeinsamkeiten zu den Rubellinen A - D im Bereich der neuen, direkten C-C-Bindung (C-15 mit C-25). Weiterhin zeigt das neue Carbonylsignal im HMBC-Spektrum Kopplungen zu den Protonen in Position C-14, C-20 und C-22, womit die Lage im Molekül als gesichert betrachtet werden kann (Abbildung 3.13).

Im oberen Teil unterscheiden sich die beiden Verbindungen analog zu den Rubellinen A und B bzw. C und D durch das Kopplungsmuster eines AB-Spinsystems (2 benachbarte Protonen in Position C-2 und C-3 bei Uredinorubellin I) von einem Dreier-Spinsystem (ABX-Spinsystem bei Uredinorubellin II). Alle weitere 2D-NMR-Kopplungsdaten (^1H - ^1H -COSY-, ^1H - ^1H -NOESY- und ^{13}C - ^1H -HMBC-Spektren) bestätigen die Strukturformeln von Uredinorubellin I und II (siehe Anhang Tabelle A.7 und A.8). Im Unterschied zu den Rubellinen A und B zeigen die beiden neuen Verbindungen deutlicher, dass der untere Teil des Gesamtmoleküls von einem Anthrachinon-Grundkörper abstammen könnte. Dies lässt die Vermutung zu, dass Uredinorubellin I und II biosynthetische Vorstufen darstellen, wobei eine Ringerweiterung durch Acylwanderung (Gritsan & Klimenko, 1993; Roslund et al., 2008) oder eine enzymkatalysierte Baeyer-Villiger-Oxidation (Roberts & Wan, 1998) zum 7-gliedrigen Lactonring offensichtlich noch nicht stattgefunden hat. Diese strukturelle Eigenschaft und der bereits erfolgte Nachweis von einfachen Anthrachinon-Monomeren in Form der Verbindungen Helminthosporin und Chrysophanol (siehe oben) lassen eine vorangegangene Dimerisierung zweier Anthrachinone vermuten. Solche enzymvermittelte Bildung von Bianthrachinonen wurde bereits für Alizarin und Purpurin beschrieben (Arrieta-Baez et al., 2002). Hierbei reagieren Peroxidase-katalysiert in einer Oxidationsreaktion Alizarin und Purpurin zu dem korrespondierenden Dimer 3,30-Bializarin und der Verbindung 3,30-Bipurpurin. In einer analogen Reaktion entsteht aus Quinizarin und Anthracenon 2,20-Biquinizarin. Bei einer vergleichbaren oxidativen Verknüpfung von zwei Molekülen Chrysophanol zwischen C-5 und C-11 könnte ein Vorläufer-Dimer von Uredinorubellin II entstehen. Als mögliche Vorstufen für Uredinorubellin I wären bei einer analogen Reaktion Helminthosporin für den oberen Teil des Moleküls und Chrysophanol für den unteren Teil denkbar. In diesem Zusammenhang sei nochmals auf die veränderte Anthrachinon-Benennung von Arnone et al. (1986, 1989) hingewiesen, welche auch für Uredinorubellin I und II übernommen wurde.

Tabelle 3.10: ^{13}C - und ^1H -Verschiebungen [ppm] von Uredinorubellin I und II (gemessen in Tetrahydrofuran- d_8 , 30 °C).

C-Atom	Uredinorubellin I		Uredinorubellin II		DEPT
	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm]	
1	159,07	-	164,21	-	C
2	130,45	7,36	124,89	7,32	CH
3	129,97	7,33	137,84	7,77	CH
4	158,17	-	120,13	7,82	C/CH
4a	114,21	-	135,30	-	C
5	139,72	-	139,56	-	C
6	156,27	-	156,40	-	C
7	121,92	7,05	121,51	7,02	CH
8	164,55	-	164,39	-	C
8a	115,77	-	115,69	-	C
9	191,73	-	193,72	-	C
9a	113,55	-	116,90	-	C
10	188,96	-	183,35	-	C
10a	129,86	-	129,82	-	C
11	47,03	5,37	46,77	5,29	CH
12	127,98	5,96	128,13	5,92	CH
13	126,07	5,83	125,89	5,79	CH
14	67,71	4,50	67,79	4,50	CH
15	76,86	-	76,86	-	C
16	51,14	-	51,15	-	C
17	36,83	4,34/2,25	36,89	4,31/2,20	CH ₂
18	73,70	4,15	73,74	4,11	CH
19	144,50	-	144,53	-	C
20	123,77	6,67	123,73	6,65	CH
21	149,89	-	149,83	-	C
22	118,69	6,79	118,67	6,78	CH
23	165,20	-	165,21	-	C
24	112,28	-	112,30	-	C
25	201,84	-	201,91	-	C
26	22,01	2,32	21,85	2,31	CH ₃

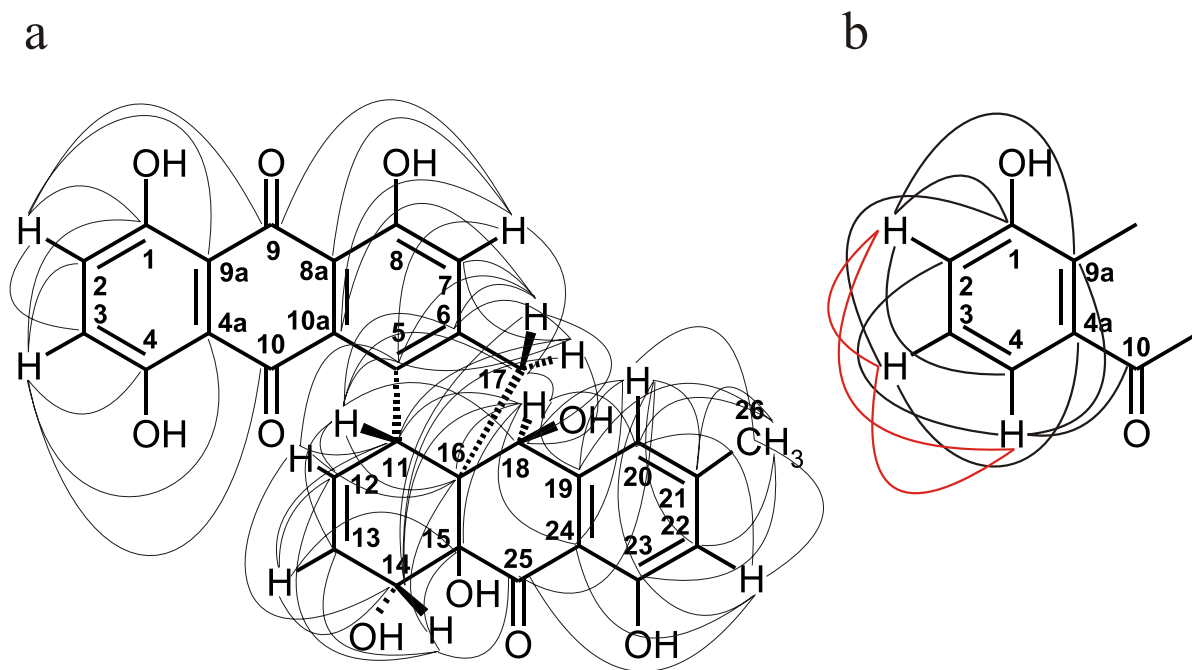


Abbildung 3.13: Strukturformel von Uredinorubellin I. Dargestellt sind die ^{13}C - ^1H -Kopplungsmuster eines HMBC-Spektrums (a) und ein Strukturformelausschnitt von Uredinorubellin II (b) mit ausgewählten HMBC-Kopplungen (schwarz) sowie Kopplungen im ^1H - ^1H -COSY-dqf-Spektrum (rot).

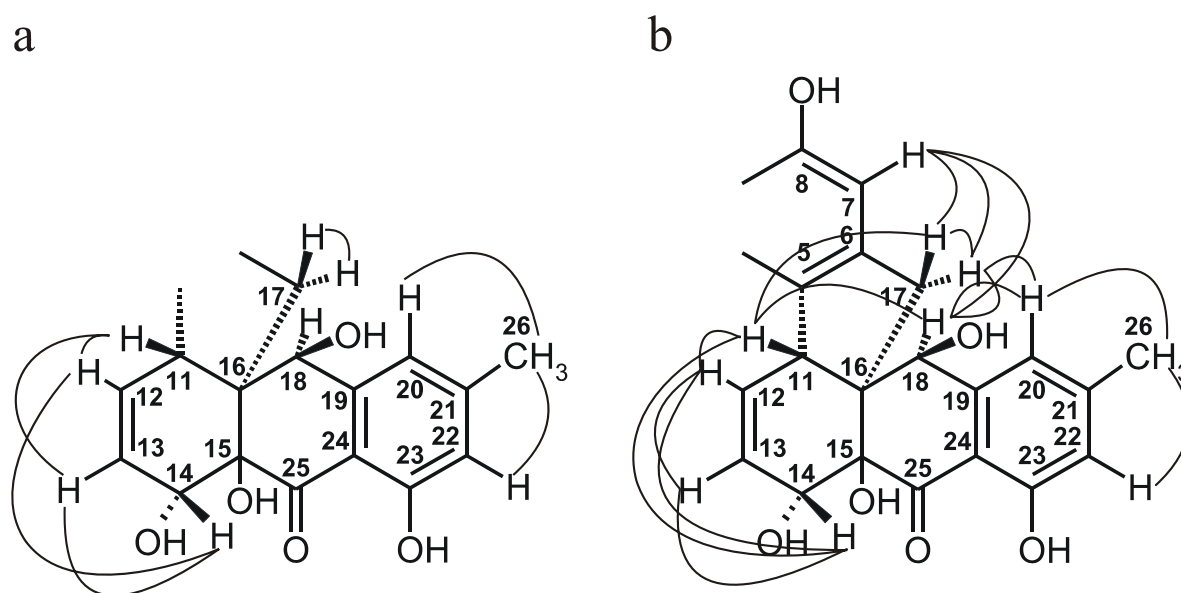


Abbildung 3.14: Ausschnitte der Strukturformel von Uredinorubellin I. Dargestellt sind ^1H - ^1H -Kopplungsmuster eines COSY-dqf-Spektrums (a) und ^1H - ^1H -Kopplungsmuster eines NOESY-Spektrums (b).

Ure_4 und Ure_5

Zwei weitere aus der Art *R. uredinicola* isolierte Minorkomponenten konnten aufgrund ihrer geringen Substanzmenge und unzureichender Stabilität nur teilweise strukturell beschrieben werden.

Grundlegende Strukturhinweise geben die ermittelten molekulare Masse von 540 für Ure_4 bzw. 524 Da für Ure_5. Die daraus resultierende Differenz von 2 Da zu den bekannten Rubellinen B und D bzw. A und C lässt eine Analogie zu 14-Dehydrorubellin D vermuten. Weitere mit den Rubellinen übereinstimmende Daten aus UV/Vis- und IR-Messungen (Tabelle 3.3 und Anhang A. III) stützen diese Annahme.

Die Stabilität der Verbindungen in Lösung (10 mg/ml in DMSO-*d*₆, 30 °C) über wenige Stunden ermöglichte die Aufnahme von ¹H-Spektren (siehe Anhang Abbildung A.1 - A.3) und somit einen weiteren Einblick in die mit bereits beschriebenen Verbindungen gemeinsame Grundstruktur. In Tabelle 3.11 sind die ermittelten chemischen Verschiebungen der Protonen von Ure_4 und Ure_5 im Vergleich zu denen von Rubellin C bzw. D sowie zu deren Dehydro-Form aufgeführt. Auffällig ist zunächst die schon bei den Rubellinen beschriebene Grundstruktur der Substituenten im Bereich der Positionen C-2, C-3, C-4 und der damit verbundenen Änderung im chromophoren System der Verbindungen. So weist Ure_4 in Analogie zu Rubellin D mit seinen zwei *ortho*-ständigen aromatischen Protonen ein AB-Spinsystem auf. Bei Ure_5 handelt es sich wie bei Rubellin C offenbar um ein ABX-Spinsystem mit drei benachbarten H-Atomen wobei das Proton in Position C-3 (δ_{H} 7,77) als Triplett vorliegt (siehe Anhang Abbildung A.3a).

Beide Strukturen weisen jeweils eindeutig eine CH₂- bzw. CH₃-Gruppe auf. Während die chemische Verschiebung der CH₃-Gruppe (2,4 ppm) und ihrer beiden benachbarten aromatischen Protonen an C-20 und C-22 nahezu identisch mit denen der Rubelline ist, weist die CH₂-Gruppe jedoch eine deutliche Beeinflussung hinsichtlich ihrer nachbarschaftlichen Verhältnisse auf. So zeigen Ure_4 und Ure_5 analog zu 14-Dehydrorubellin D eine Differenz von über 0,5 ppm zwischen den beiden Protonen an Position C-17, während die Hydroxy-Formen (Rubellin D bzw. C) Unterschiede von mehr als 1 ppm vorweisen. In unmittelbarer Nachbarschaft zu den veränderten Signalen der Protonen an Position C-17 befinden sich zwei weitere charakteristische Verschiebungen. Es handelt sich um die Positionen C-12 und C-13, welche eindeutig über eine Allylkopplung angesprochen werden können. Auch hier zeigen die beiden neuen Strukturen Gemeinsamkeiten zur Dehydro-Form von Rubellin D. Die Differenz der chemischen Verschiebung beträgt aufgrund der benachbarten Ketogruppe am C-14 0,8 ppm, während bei Rubellin D eine Auflösung der beiden Signale im ¹H-Spektrum nicht

möglich ist. Im Vergleich dazu ist die Veränderung bei Ure_5 ähnlich, bei Ure_4 beträgt sie sogar 1,7 ppm. Beachtet man die Ähnlichkeit aller fünf verglichenen Moleküle im oberen bzw. unteren Teil, grenzt sich die Lage der neuen Ketogruppe auf einen engen Bereich des Moleküls im unteren Teil (C-11 bis C-15) ein.

Unter Berücksichtigung der erhaltenen Daten (MS, IR, HPLC und ^1H -Spektrum), sowie der offensichtlichen Analogien zu 14-Dehydrorubellin D kann die Existenz der neuen Dehydro-Formen als gesichert ansehen werden. Einschränkend muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die Position der neuen Ketogruppe nicht sicher bestimmt werden konnte.

Tabelle 3.11: Ausgewählte ^1H -Verschiebungen aus den jeweiligen ^1H -Spektren von Ure_4 und Ure_5 (gemessen in $\text{DMSO}-d_6$ bei $30\text{ }^\circ\text{C}$), Rubellin C ($\text{Acetonitril}-d_3$ ($65\text{ }^\circ\text{C}$), sowie Rubellin D und 14-Dehydrorubellin D ($\text{THF}-d_8$, $30\text{ }^\circ\text{C}$).

δ_{H} [ppm]	Ure_4	Ure_5	Rubellin C	Rubellin D	14-Dehydro-rubellin D
C ₂ -H	7,46	7,62	7,71	7,29	7,33
C ₃ -H	7,46	7,77	7,28	7,29	7,33
C ₄ -H	-	7,35	7,71	-	-
C ₇ -H	6,26	7,34	7,18	7,19	7,29
C ₁₂ -H	7,44	6,58	5,69	5,70	6,71
C ₁₃ -H	5,77	5,92	5,76	5,70	5,92
C ₂₀ -H	6,86	6,95	6,99	6,99	7,00
C ₂₂ -H	6,82	6,75	6,74	6,68	6,74
C ₁₇ -H ₂	2,95/2,86	3,34/2,95	4,26/3,15	4,49/3,14	3,42/3,12
C ₂₆ -H ₃	2,42	2,37	2,37	2,38	2,41

3.3 Strukturformeln (Übersicht)

Insgesamt konnten zwei Anthrachinone und 11 Anthrachinon-Derivate aus den beiden eng verwandten Pilzarten *R. collo-cygni* und *R. uredinicola* isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden (Abbildung 3.15). Es handelt sich zum einen um die aus *Mycosphaerella rubella* beschriebenen Verbindungen Rubellin A - D (Arnone et al., 1986; 1989) und die beiden ubiquitär in diversen Pilzen und Pflanzen vorkommenden Anthrachinone Chrysophanol (Danielsen & Aksnes, 1992) und Helminthosporin (Fokou, 2006). Neu beschrieben werden konnten die Verbindungen Rubellin E und F mit ihrer offenen Ringform im Bereich des Lactons, ebenso die beiden eng verwandten Verbindungen Uredinorubellin I und II, welche sich analog zu den Rubellinen E und F nur durch die Existenz einer Hydroxygruppe an Position C-4 voneinander unterscheiden und abschließend die Substanzen Caeruleoramularin I und II, deren chinoide Grundstruktur durch die biosynthetische Verschiebung der Ketogruppe von Position C-10 zu C-4 nicht mehr vorhanden ist. Auch hier sind wieder die beiden Grundformen im unteren Teil des Moleküls als 7-gliedriger (Caeruleoramularin I) und 5-gliedriger Lactonring (Caeruleoramularin II) vorhanden.

IUPAC-Nomenklatur

Die Nomenklatur der isolierten Verbindungen nach den gültigen IUPAC-Regeln erfolgte mit Hilfe der Software der Firma ACD-Labs bzw. von Dr. U. Roessler (FIZ Chemie, Berlin) und ist im Anhang (siehe A.I) dargestellt. Es ist zu beachten, dass die Nummerierung der C-Atome nach der IUPAC-Nomenklatur nicht mit der Nummerierung in den Strukturabbildungen übereinstimmt, die aus Gründen besserer Vergleichbarkeit von Arnone et al. (1986, 1989) übernommen wurde. Ausgenommen sind die Anthrachinone Helminthosporin und Chrysophanol.

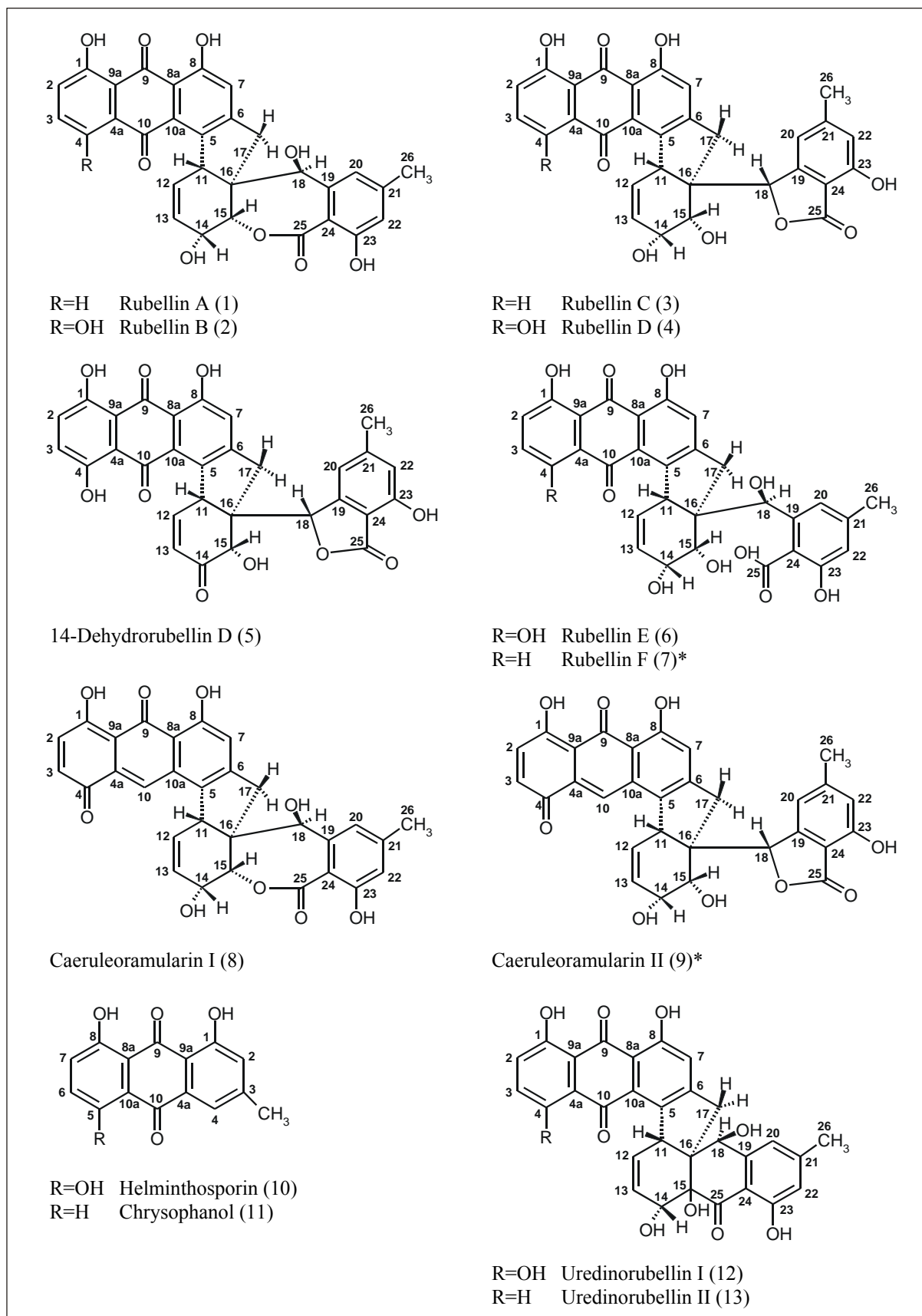


Abbildung 3.15: Strukturformeln der aus *R. collo-cygni* bzw. *R. uredinicola* isolierten Verbindungen (* Strukturvorschläge).

3.4 Wachstums- und Bildungskinetik bei *R. collo-cygni*

Eine Wachstums- und Bildungskinetik der Verbindungen wurde aufgenommen, um den Zeitpunkt der optimalen Ausbeute für die jeweiligen Metabolite bestimmen zu können. In Abbildung 3.16 sind die gebildeten Mengen der Hauptverbindungen (Rubellin A - D) im zeitlichen Verlauf den beiden Parametern Mycelfrischgewicht bzw. Glucosekonzentration (als Kohlenstoffquelle) gegenübergestellt. Ein Überblick über die Produktionsmengen der Verbindungen aus beiden produzierenden Arten über einen definierten Kultivierungszeitraum, jedoch unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen, gibt Tabelle 3.12 (Kapitel 3.6).

Während die beiden Verbindungen A und C nur in geringen Mengen vorliegen, stellen Rubellin B und D um den 15. Kultivierungstag den Hauptteil dar. Aufgrund der nicht-enzymatischen pH-Wert-abhängigen Umwandlungsprozesse von Rubellin A zu C und Rubellin B zu D sind in Abbildung 3.16b die jeweiligen Summen dargestellt (absolute Werte im Anhang Tabelle A.12). In dieser Abbildung wird deutlich, dass es sich um eine wachstumsassoziierte Bildung dieser Sekundärmetabolite handelt. Mit zunehmendem Mycelfrischgewicht steigt vor allem die Menge von Rubellin B und D. Nach dem 15. Kultivierungstag kommt es aufgrund der komplett verwerteten Kohlenstoffquelle Glucose zur Wachstumsstagnation und folglich zum Erliegen der Rubellin-Produktion.

Auf Unterschiede bezüglich der Bildungsmengen in Kulturfiltrat und Mycel wird in Kapitel 3.5 (Stämme- und Artenvergleich) näher eingegangen. Die Produktionsmengen variieren zum Teil beträchtlich innerhalb der Art *R. collo-cygni*. Aus den hier erhobenen Daten lassen sich nur Aussagen bezüglich des Stammes 43/3 machen. Hinsichtlich der Verhältnisse in Kulturfiltrat und Mycel können folgende Aussagen abgeleitet werden. Rubellin B stellt im Mycel nach 13 Tagen die Hauptverbindung dar und nimmt zum 21. Kulturtag hin um 50 % ab, während Rubellin D parallel dazu bis zum 21. Tag zunimmt. Ähnliche Entwicklungen liegen im Kulturfiltrat vor, wobei hier Rubellin B nur in geringen Mengen und mit einem Maximum am 15. Tag vorliegt, Rubellin D hingegen über den gesamten Zeitraum zunimmt. Analoge Verhältnisse weisen die beiden gelb gefärbten Verbindungen (Rubellin A und C) auf, obgleich in viel geringerem Umfang. Vor dem Hintergrund, dass die Verbindungen mit dem 7-gliedrigen Lactonring (Rubellin A und B) *in vitro* pH-Wert-abhängig und irreversibel in die 5-gliedrige Form (Rubellin C und D) überführbar sind, kann davon ausgegangen werden, dass Rubellin B im Mycel gebildet und nach der Ausscheidung ins Kulturfiltrat nicht-enzymatisch zu Rubellin D umgewandelt (Daten siehe Anhang Tabelle A.13) wird. Die jeweiligen Mengenverhältnisse in Kulturfiltrat bzw. Mycel werden durch die folgenden DC-Experimente zum Stämme- und Artenvergleich gestützt (Abbildungen 3.19 - 3.23).

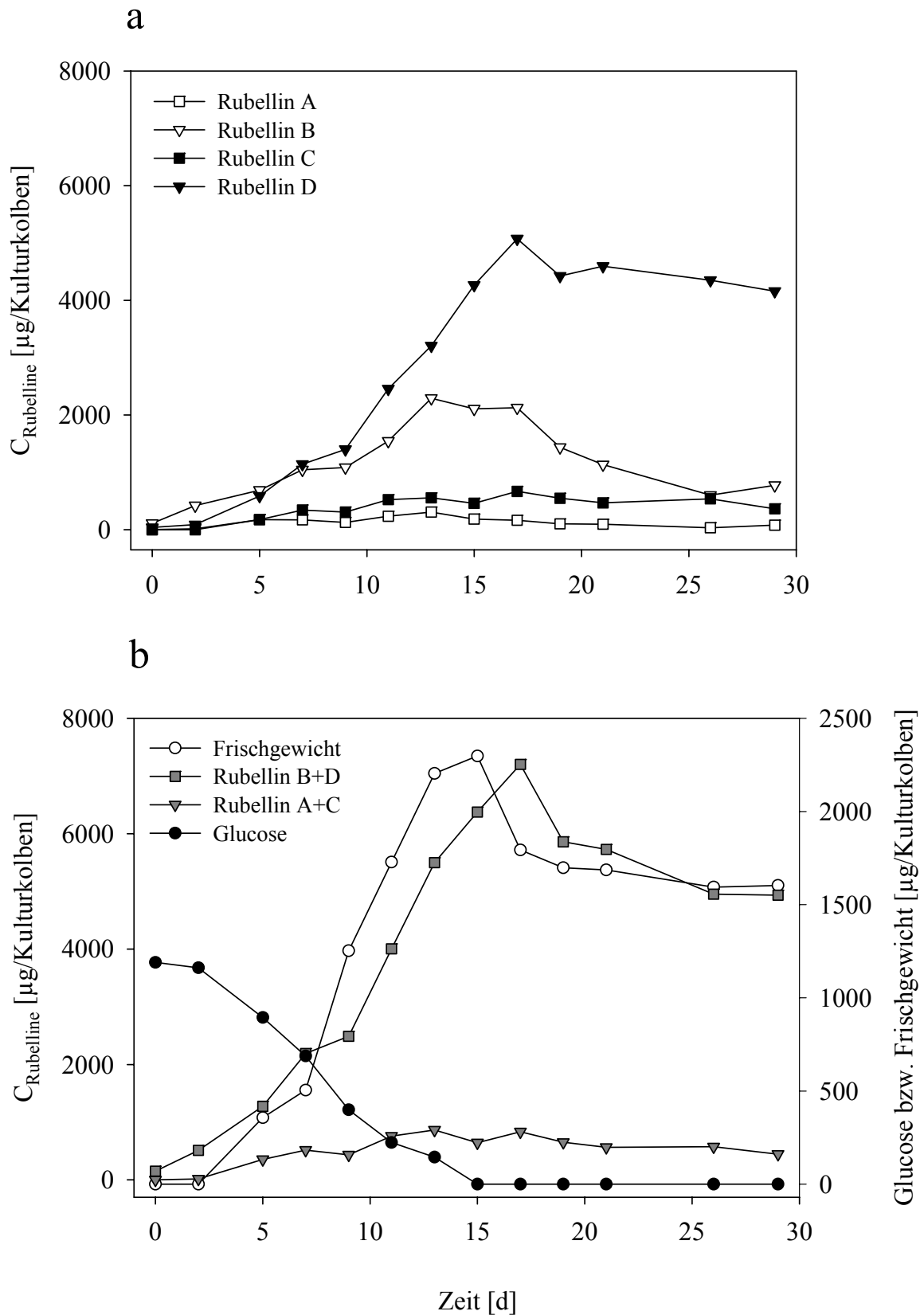


Abbildung 3.16: Bildungs- und Wachstumskinetik. a) Bildungskinetik der Hauptverbindungen (Rubellin A - D), b) Mycelfrischgewicht/Glucose-Konzentration in Abhängigkeit von der Rubellin-Produktion (Werte für A und C bzw. B und D zusammengefasst) in Kulturfiltrat und Mycel.

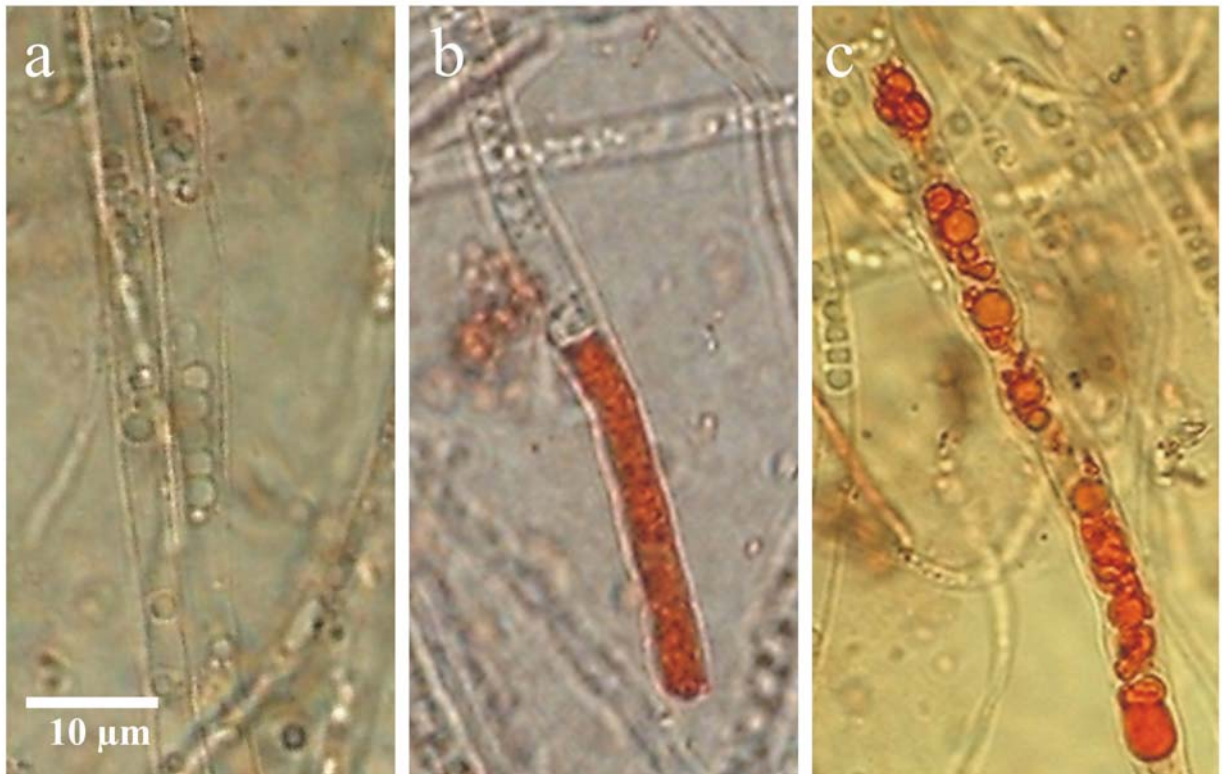


Abbildung 3.17: Hyphen einer submersen Hauptkultur. a) unpigmentierte, hyaline Hyphe, b) terminale Hyphe mit roten Sekundärmetaboliten, c) akkumulierte rot gefärbte Verbindungen innerhalb des Mycels.

Für morphologische Untersuchungen hinsichtlich der Bildungsorte bzw. Ablagerung der farbigen Metabolite, wurden *Batch*-Kulturen 14 Tage lang in V8-Flüssigmedium inkubiert. Das zu untersuchende Mycel wurde entnommen, auf einen Objektträger mit Wasser überführt und bei 1000facher Vergrößerung mikroskopiert. Wie Abbildung 3.17 zu entnehmen ist, werden die Verbindungen in separaten Einschlusskörpern oder, wie in b) zu sehen, in ganzen Septen abgelagert. Der Pilz separiert, offensichtlich zum eigenen Schutz, die toxischen Verbindungen in abgeschlossenen Kompartimenten. Die Mehrzahl der Hyphen liegen allerdings in hyaliner, unpigmentierter Form (a) vor. In bisherigen Arbeiten wurden die Hyphen ausschließlich als hyalin beschrieben (Sutton & Waller, 1988; Sutton, 1991; Braun, 1998). Die Pigmentierung konnte nur unter Fermentationsbedingungen beobachtet werden, *in natura* dürften solche Phänomene jedoch kaum zu beobachten sein.

3.5 Stämme- und Artenvergleich hinsichtlich der Rubellin-Produktion

Verglichen wurden 16 verschiedene Stämme von *R. collo-cygni* verschiedener Herkunft (Deutschland, Österreich, Schweiz, Tschechien, Schottland, Neuseeland, Argentinien und Uruguay) und 5 weitere *Ramularia*-Arten nach 21-tägiger Kultur hinsichtlich ihres Toxinspektrums in Kulturfiltrat und Mycel. Die Auswertung erfolgte qualitativ über DC und quantitativ über analytische HPLC hinsichtlich der Hauptverbindungen (Rubellin B, C und D). Als Standards wurden die Rubelline B - F mitgeführt. Wie aus den Dünnschichtchromatogrammen (Abbildung 3.19 - 3.23) ersichtlich wird, sind alle *R. collo-cygni*-Stämme und *R. uredinicola* zur Bildung der Rubelline befähigt. Die Produktionsmenge variiert allerdings zum Teil beträchtlich. Während die Stämme 43/3 und 103 große Mengen (> 8 mg Rubellin D/Kulturkolben) biosynthetisieren, bilden einige Stämme (94/2, 95/1, 141, 197) hingegen nur etwa ein Zehntel davon (Abbildung 3.22). Die Verbindungen Caeruleoramularin I und II wurden nur von den Stämmen 43/3, 55 und 79 in gut detektierbaren Mengen sowie von 38, 86/1, 86/3 und 103 in Spuren gebildet. Eine genaue Quantifizierung dieser beiden Verbindungen konnte aufgrund zu geringer Mengen jedoch nicht erfolgen. Die Rubelline E und F wurden unter den verwendeten Extraktionsbedingungen (Ansäuerung des Kulturfiltrates zur Erhöhung der Produktausbeute) zu Rubellin D bzw. C umgewandelt (siehe Kapitel 3.2.3). Als Hauptproduktionsstamm wurde 43/3 zum Vergleich auf allen DC-Platten mit aufgetragen. Die Analyse der Arten *R. inaequalis* (90), *R. pratensis* (89), *R. rubella* (RR) und *R. graevilliana* (208) sowohl mit DC als auch mit analytischer HPLC zeigt deutlich, dass diese Arten nicht zur Rubellin-Produktion befähigt sind.

Einen weiteren möglichen Rubellin-Produzenten könnte die Art *R. rosea* darstellen. Ähnlich wie *R. uredinicola* bildet dieser Pilz rötliche Pigmente in alternden Hyphen aus (Khodaparast & Braun, 2005). Bei dieser Art handelt es sich um eine rein parasitisch auf *Salix* lebende Art, die auf Blättern neben Rostpilzen als Sprenkelkrankheit in Erscheinung treten kann (Ellis & Ellis, 1997; Kenneth, 2001).

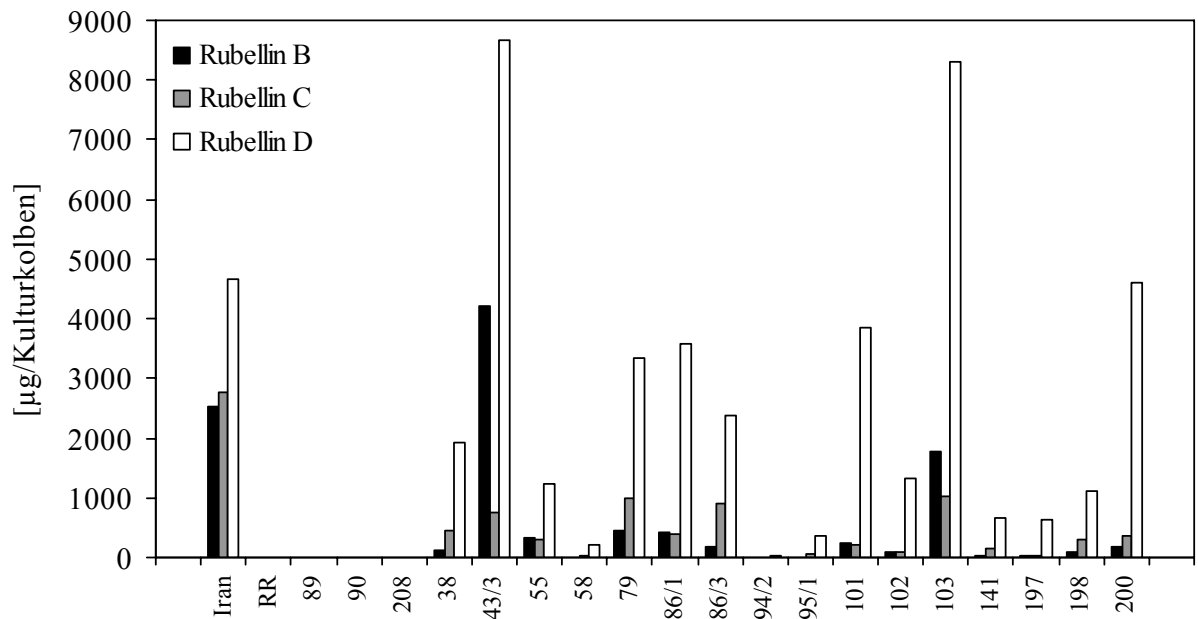


Abbildung 3.18: Gesamtproduktbildung aus Kulturfiltrat und Mycel der untersuchten Stämme von *R. collo-cygni* und *Ramularia*-Arten (*R. uredinicola* (IRAN), *R. rubella* (RR), *R. pratensis* (89), *R. inaequalis* (90) und *R. grevilleana* (208)).

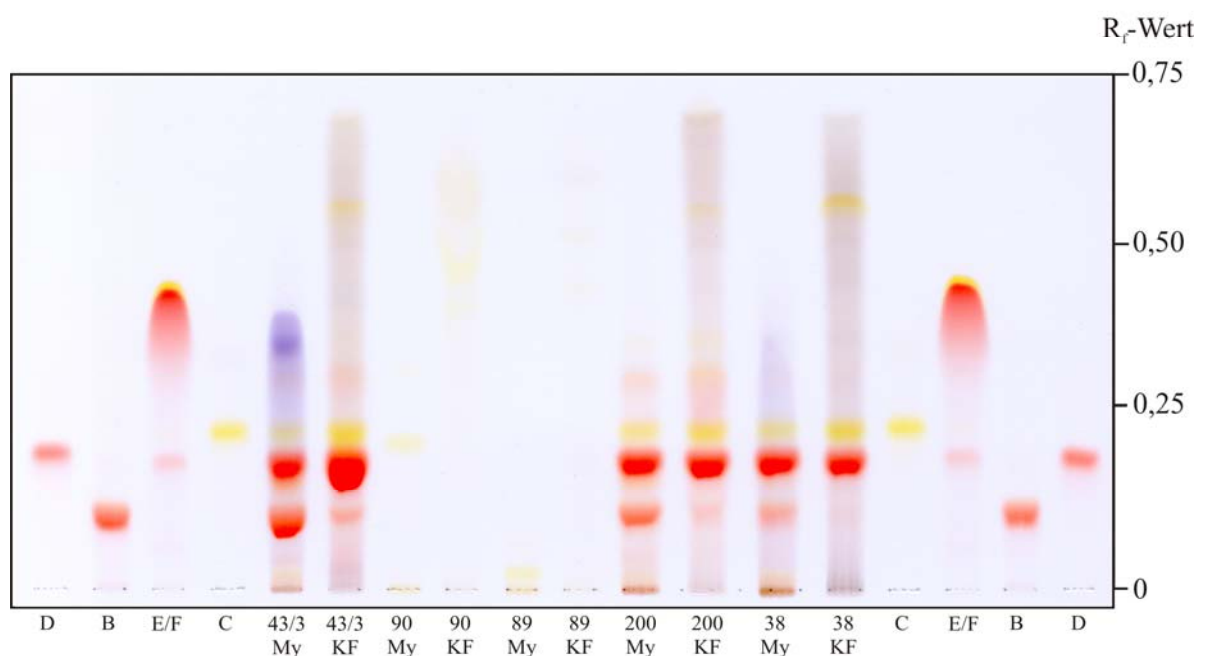


Abbildung 3.19: DC (RP-18, LM B₁). Aufgetragen sind adäquate Konzentrationen der Ethylacetat-Extrakte diverser Stämme von *R. collo-cygni*.

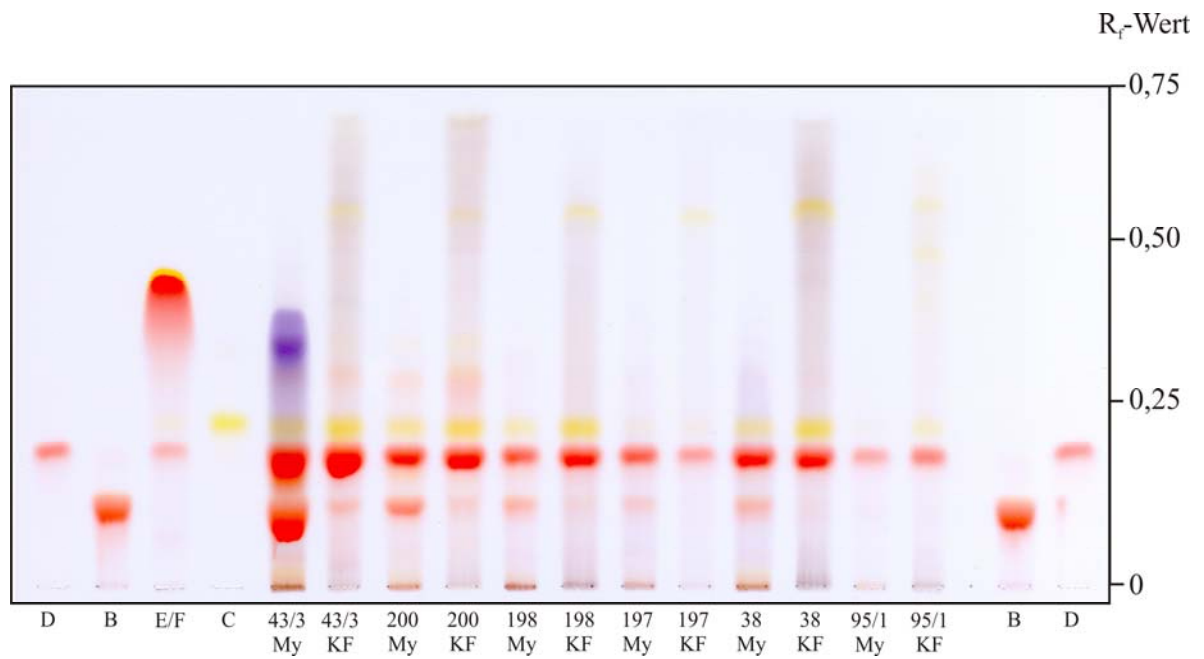


Abbildung 3.20: DC (RP-18, LM B₁). Aufgetragen sind adäquate Konzentrationen der Ethylacetat-Extrakte diverser Stämme von *R. collo-cygni*.

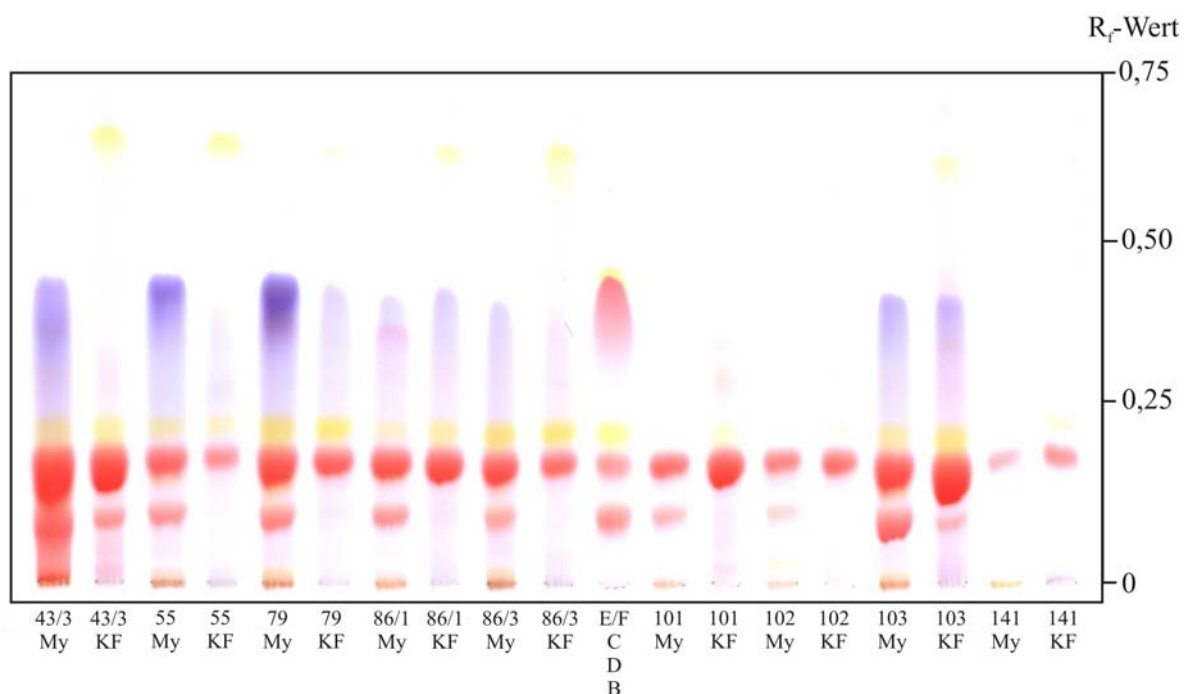


Abbildung 3.21: DC (RP-18, LM B₁). Aufgetragen sind adäquate Konzentrationen der Ethylacetat-Extrakte diverser Stämme von *R. collo-cygni*.

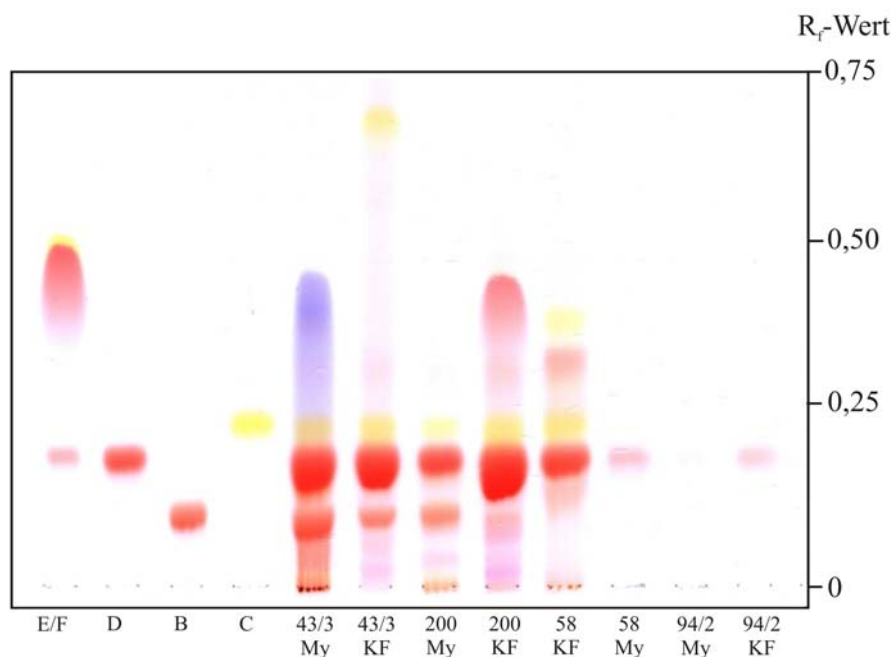


Abbildung 3.22: DC (RP-18, LM B₁). Aufgetragen sind adäquate Konzentrationen der Ethylacetat-Extrakte diverser Stämme von *R. collo-cygni*.

3.6 Spektrum der von *R. collo-cygni* und *R. uredinicola* gebildeten Anthrachinon-Derivate

Das Toxinspektrum der Rubellin-produzierenden Arten *R. collo-cygni* und *R. uredinicola* zeigt eine ähnliche Zusammensetzung (Abbildung 3.23). In Tabelle 3.12 sind absolute Produktionsmengen in Kulturfiltrat und Mycel im Überblick dargestellt. Es handelt sich dabei um ausgewählte typische bzw. repräsentative Kultivierungen, wobei jedoch bemerkt werden muss, dass die individuellen Produktionsmengen verschiedener Ansätze zum Teil stark schwankten. Offenbar spielt bei diesen Pilzen ein circannualer Rhythmus eine gewisse Rolle. Dieses Phänomen wurde jedoch nicht weiter untersucht.

Generell kann beim Vergleich der Arten festgestellt werden, dass beide die bekannten Rubelline A - D biosynthetisieren, wobei individuelle Unterschiede in den Mengen deutlich wurden. Während *R. uredinicola* tendenziell mehr gelb gefärbte Metabolite (Rubellin A und C) produziert, überwiegen bei *R. collo-cygni* die „roten“ Substanzen (Rubellin B und D). Ein sehr auffälliger Unterschied ist die Biosynthese der blau gefärbten Verbindungen (Caeruleoramularin I und II). So konnten diese Verbindungen im hyperparasitären Pilz *R. uredinicola* nicht nachgewiesen werden. Ein ähnliches Bild ergab sich auch für einige Stämme von *R. collo-cygni* (siehe Kapitel 3.5). Bezüglich der physiologischen Eigenschaften beider Arten ist anzumerken, dass *R. uredinicola* langsamer Mycel aufbaute und somit länger in Kultur gehalten werden musste. Beide *Ramularia*-Arten zeigten in Standkulturen eine

deutlich verminderte Produktausbeute, wobei *R. collo-cygni* jedoch nur noch marginale Mengen produzierte. Offensichtlich gibt es also einen Zusammenhang zwischen Belüftung (durch Schüttelkultur), dem damit zur Verfügung stehendem Luftsauerstoff und der Metabolitenbildung. Diese Vermutung wird durch die erhöhte Syntheserate der „roten“ Verbindungen in den Schüttelkulturen unterstützt. Durch Zufuhr von Sauerstoff wird offensichtlich die Oxidation der gelb gefärbten Verbindungen (Rubellin A, C oder Uredinorubellin II) zu ihren jeweiligen Hydroxy-Derivaten (Rubellin B, D oder Uredinorubellin I) begünstigt.

Auch die beiden einfachen Anthrachinone Helminthosporin und Chrysophanol als eventuelle biosynthetische Präkursoren (siehe Kapitel 3.9) sind hauptsächlich in der Standkultur von *R. uredinicola*, in allen anderen Ansätzen nur in Spuren, nachweisbar.

Die lichtinduzierte Bildung der Rubelline (und verwandter Verbindungen) kann als gesichert angesehen werden, da aus Kulturen in absoluter Dunkelheit keine nennenswerten Mengen der Sekundärmetaboliten nachgewiesen werden konnten.

Tabelle 3.12: Spektrum der von *R. collo-cygni* und *R. uredinicola* gebildeten Anthrachinon-Derivate. Gegenübergestellt sind die jeweiligen Summen der Substanzmengen aus Kulturfiltrat und Mycel unter verschiedenen Kulturbedingungen (1 - 6). *) in [mAU/Kulturkolben] gemessen bei der jeweiligen λ_{\max} im Vis-Bereich (Tabelle 3.3).

Verbindung [mg/Kulturkolben]	<i>Ramularia collo-cygni</i>			<i>Ramularia uredinicola</i>		
	1	2	3	4	5	6
Rubellin A	1,35	0,32	<0,01	2,54	1,49	2,90
Rubellin B	6,15	4,56	0,36	5,09	2,54	1,19
Rubellin C	2,72	1,31	0,32	0,51	2,78	0,81
Rubellin D	6,21	14,65	1,09	0,47	4,66	0,28
14-Dehydrorubellin D	0,10	0,39	<0,01	0,28	1,09	n.n.
Caeruleoramularin I	4,91	2,06	0,72	n.n.	n.n.	n.n.
Caeruleoramularin II	0,81	0,40	<0,01	n.n.	n.n.	n.n.
Helminthosporin	0,03	<0,01	n.n.	0,10	0,08	1,11
Chrysophanol	0,03	<0,01	n.n.	0,02	0,02	1,11
Uredinorubellin I	0,59	0,47	0,17	2,30	2,63	0,92
Uredinorubellin II	0,52	0,41	<0,01	1,45	1,10	1,07
Ure_4*	1,52x10 ⁷	n.n.	n.n.	6,72x10 ⁷	5,57x10 ⁷	2,68x10 ⁷
Ure_5*	n.n.	4,21x10 ⁶	n.n.	1,20x10 ⁷	2,96x10 ⁷	2,72x10 ⁷

- 1 - Schüttelkultur (14d), Phosphatpuffer-Medium
- 2 - Schüttelkultur (14d), Normalmedium
- 3 - Standkultur (29d), Normalmedium
- 4 - Schüttelkultur (18d), Phosphatpuffer-Medium
- 5 - Schüttelkultur (18d), Normalmedium
- 6 - Standkultur (35d), Normalmedium

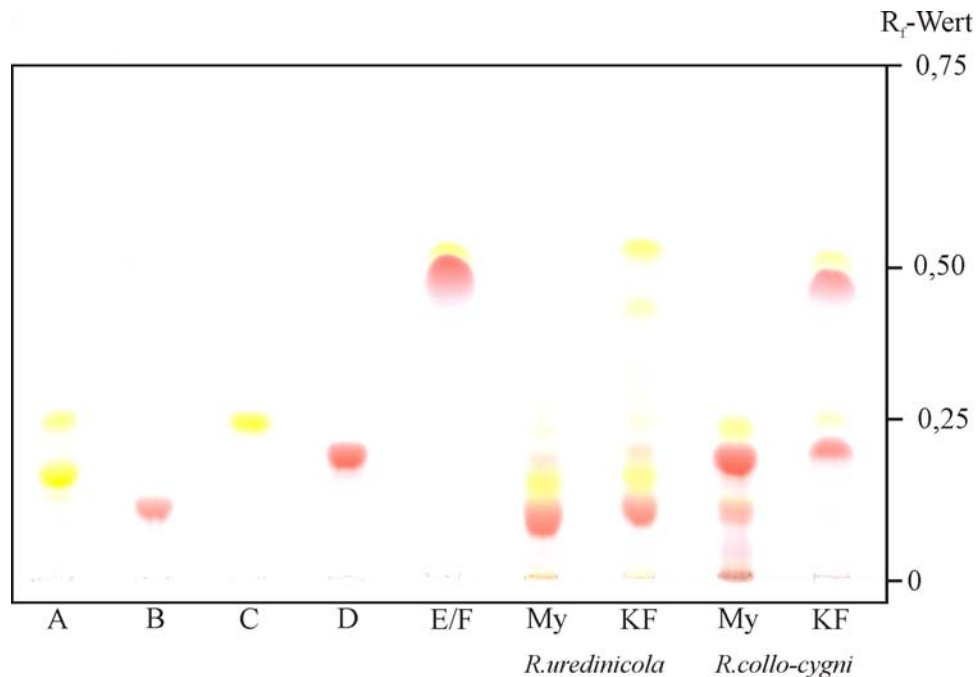


Abbildung 3.23: DC (RP-18, LM B₁). Aufgetragen sind adäquate Konzentrationen der Ethylacetat-Extrakte von *R. collo-cygni* (43/3) und *R. uredinicola* (IRAN).

3.7 Molekularbiologische Arbeiten

3.7.1 Phylogenetische Untersuchungen des *Ramularia*-Artkomplexes

Die Tatsache, dass die Rubelline A - D erstmals aus einer phytopathogenen *Mycosphaerella*-Art beschrieben worden sind (Arnone et al., 1986, 1989), legt die Vermutung eines phylogenetischen, möglicherweise sogar chemotaxonomischen Hintergrundes der Rubelline nahe. Über die Systematik der weit verbreiteten Gattung *Mycosphaerella* gibt es eine ganze Reihe von Veröffentlichungen, die sich mit molekularen und morphologischen Eigenschaften auseinander setzen (Stewart et al., 1999; Crous et al., 2000; Goodwin et al., 2001). Zur relativ uniformen teleomorphen Hauptfruchtform, welche nach molekular genetischen Untersuchungen der ITS-Region als Monophylum angesehen wird, sind 27 anamorphe Nebenfruchtformen bekannt, die allerdings morphologisch sehr heterogen sind (Crous et al., 2001). So werden u. a. auch *Ramularia*-Arten als anamorphe Form von *Mycosphaerella*-Arten beschrieben (z. B. Anamorphe *R. brunnea* PECK - Teleomorphe *M. fragariae* (TUL.) LINDAU (Goodwin et al., 2001)). Die Hauptfruchtformen von *R. collo-cygni* oder *R. uredinicola* sind bis dato noch nicht beschrieben, wobei Crous et al. (2000) vermuteten, dass die Teleomorphe von *R. collo-cygni*, sofern sie existiert, in der *Mycosphaerella*-Gruppe zu suchen ist. Dies stützen

die Beobachtungen eines spermogonialen Stadiums (*Asteromella*) von Braun (2004) im Freiland, sowie durch Salamati & Nyman (2008) auf Agar-Platten.

Zur phylogenetischen Untersuchung der zur Verfügung stehenden *Ramularia*-Arten und -Stämme wurden die durch PCR aus genomischer DNA amplifizierten ITS-Sequenzen über eine Datenbankabfrage (NCBI) mit publizierten Sequenzdaten (siehe Anhang Tabelle A.19) verglichen. Es konnte die Identität aller untersuchten Stämme von *R. collo-cygni* und *Ramularia*-Arten auch auf molekulargenetischer Ebene bestätigt werden. Die einzige Ausnahme bildete *R. inaequalis* die nach Datenbank-Vergleich der ITS-Sequenz als Treffer mit der höchsten Übereinstimmung die Art *Dichocladosporium chlorocephalum* (FRESEN.) K. SCHUB., U. BRAUN & CROUS (Schubert et al., 2007) offenbarte. Daher wurde diese Art bei den folgenden Analysen nicht mit einbezogen. Die Phylogenie der Arten wurde durch eine *Maximum-Parsimony*-Analyse und ein *Neighbor-Joining*-Distanzverfahren (K2P-Distanzen) berechnet. Die resultierenden Dendrogramme sind in Abbildung 3.24 und 3.25 dargestellt. Beide Darstellungen zeigen ein ähnliches Cluster-Muster. Alle hier analysierten *Ramularia*-Arten sind in einem durch 2000 *Bootstrap*-Replikate (*Neighbor-Joining*-Analyse) gut unterstützten *clade* zu finden (Abbildung 3.25). Als Hauptfruchtformen fielen nur *Mycosphaerella fragariae* und *M. rubella* in dieses *clade*. Die Zuordnung zur *Mycosphaerella*-Gruppe konnte somit ebenso eindeutig bestätigt werden wie die systematische Geschlossenheit der *Ramularia*-Gruppe (Ausnahme *R. inaequalis*). Es konnten mit den angewandten Methoden keine Unterschiede zwischen den aus verschiedenen Regionen stammenden Isolat von *R. collo-cygni* festgestellt werden. In diesem Zusammenhang sind mögliche Unterschiede im Hinblick auf Ausbreitungs- bzw. Endemiezentren der RLSD von Interesse, wie sie bereits für das Pathogen *Rhynchosporium secalis* (OUDEM.) J.J. DAVIS nachgewiesen werden konnten (Zaffarano et al., 2006). Im Falle von *R. collo-cygni* ist die Datengrundlage für solch globale Untersuchungen bisher allerdings noch zu lückenhaft bzw. gering.

Wie aus den Abbildungen 3.24 und 3.25 zu entnehmen ist, befinden sich die Rubellin-Produzenten *R. collo-cygni*, *R. uredinicola* sowie *M. rubella* innerhalb des *Ramularia*-Clusters, spalten allerdings in kein geschlossenes eigenes *subclade* auf. Somit birgt die Fähigkeit zur Rubellin-Biosynthese keine zusätzliche phylogenetische Information und ist in chemotaxonomischer Hinsicht offenbar nicht von Bedeutung.

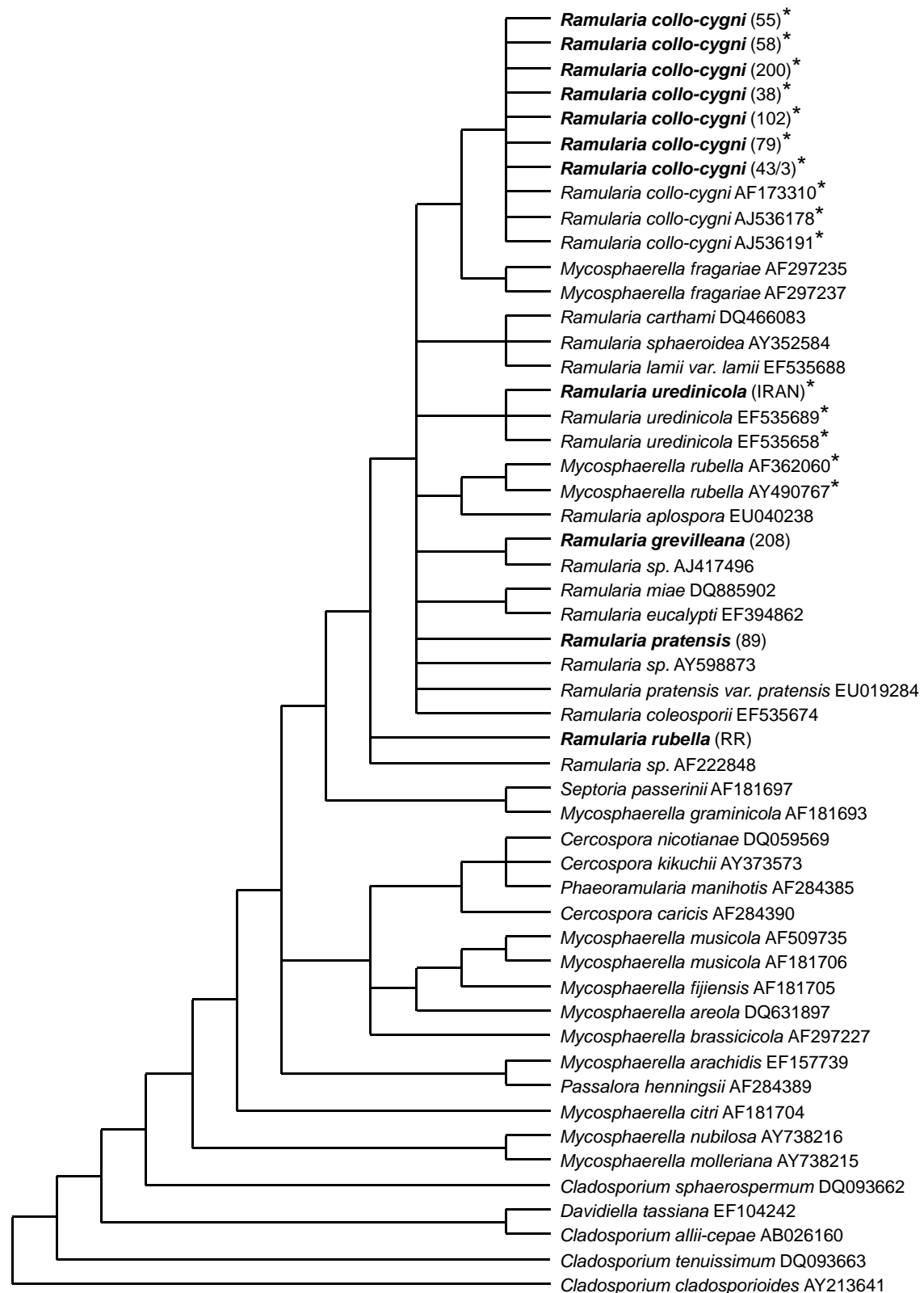


Abbildung 3.24: *Strict-Consensus-Dendrogramm* nach der *Maximum-Parsimony-Methode*, berechnet aus den 1074 sparsamsten (*most parsimonious*) Bäumen (Schrittlänge: 595; 91 *parsimony*-informative Positionen innerhalb des ITS-Alignments; RI = 0,83; CI = 0,59), Optionen: heuristische Suche, *simple sequence addition*, *tbr branch swapping*. (Außengruppe: *Cladosporium*-Arten; * Rubellin-Produzenten; in dieser Arbeit untersuchte Stämme und Arten wurden fett dargestellt.)

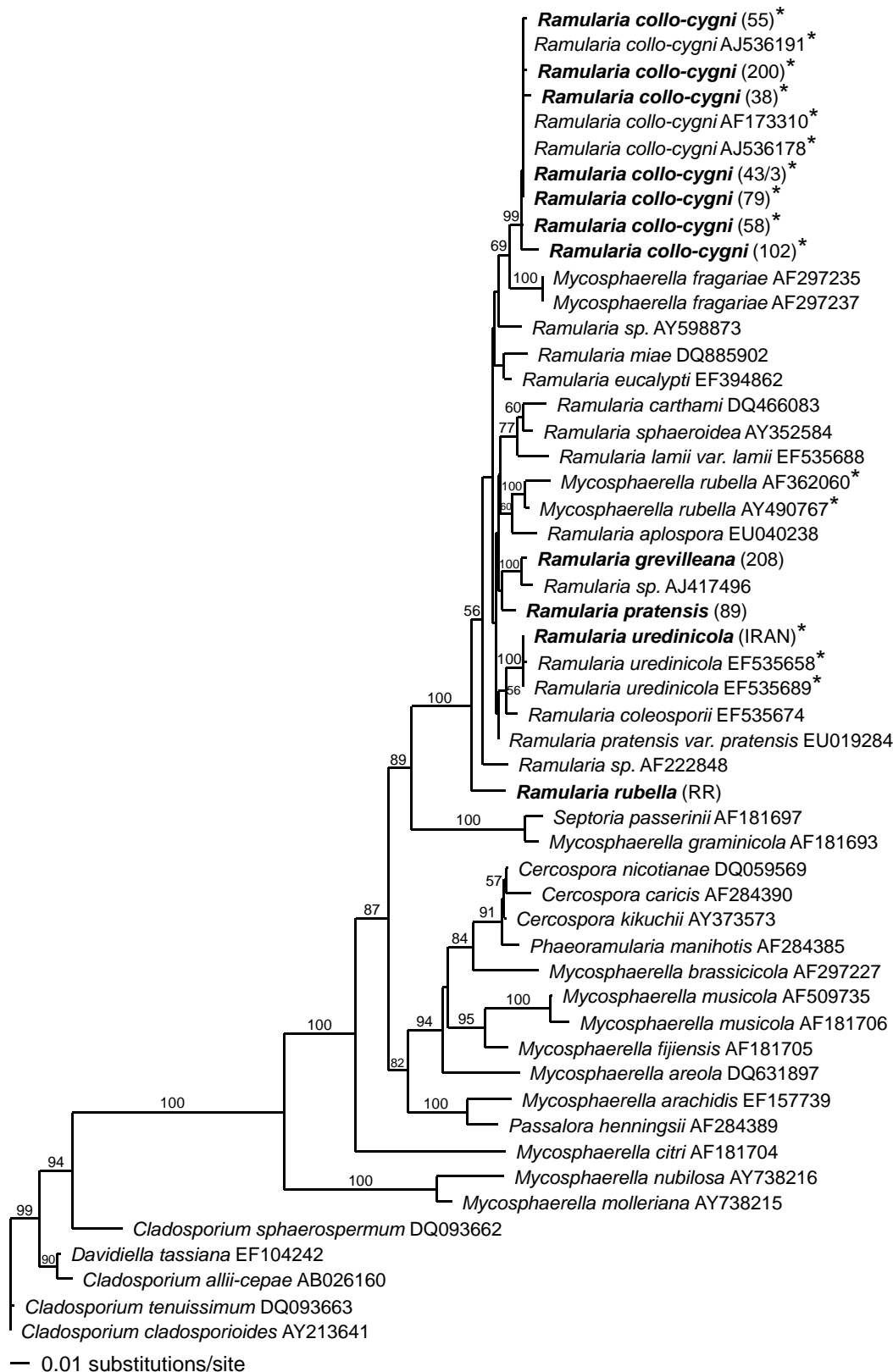


Abbildung 3.25: Neighbor-Joining-Dendrogramm der *Ramularia*-Gruppe und verwandter Taxa (52 ausgewählte Taxa). Als Distanzverfahren wurde K2P verwendet (Kimura, 1980). Die Datengrundlage bildet eine Alinierung der ITS-Region mit 504 Nukleotidpositionen. Das Dendrogramm wurde über 2000 Bootstrapreplikate verifiziert. Die Werte über den Ästen geben jeweils die prozentuale Häufigkeit in den Replikaten an. (Außengruppe: *Cladosporium*-Arten; * Rubellin-Produzenten; in dieser Arbeit untersuchte Stämme und Arten sind fett dargestellt.)

3.7.2 Analyse der PKS-Gene von *Ramularia collo-cygni* und *R. uredinicola* - ein Einstieg

Da die Bildung der im Rahmen dieser Arbeit isolierten und strukturell charakterisierten Anthrachinon-Derivate auf biochemischer Ebene dem Polyketid-Weg zweifelsfrei zuzuordnen ist (siehe 3.9), liegt die Vermutung nahe, dass die Biosynthese auf enzymatischer Ebene durch einen Polyketid-Synthase-Komplex bewerkstelligt wird. Der Reaktionsverlauf - repetitive Claisen-Kondensation mit Malonyl-CoA, ausgehend von Acetyl-CoA als Startermoleküleinheit - ist vergleichbar mit der Fettsäurebiosynthese (O'Hagen, 1995; Simpson, 1995). Ein Unterschied beider Wege besteht u. a. in der Zyklisierung der Polyketosäure. Weiterführende Reaktionen bzw. intramolekulare Veränderungen durch Hydroxylierung, Methylierung, Oxidations- und Reduktionsreaktionen oder Glykosylierungen führen zu Veränderungen des Substitutionsmusters am Grundmolekül und resultieren somit in der großen Strukturdiversität dieser Verbindungsklasse. Viele Bakterien, Pilze und Pflanzen produzieren Polyketide mit den entsprechenden Enzymkomplexen, welche auf Grund ihrer Funktionalität in verschiedene PKS-Typen unterteilt werden (Hopwood 1997; Staunton & Weissman, 2001; Austin & Noel, 2003). Der multifaktorielle Enzymkomplex wird bei Pilzen von einer Polyketid-Synthase Typ I repräsentiert, wobei die Minimal-PKS sich aus folgenden Untereinheiten zusammensetzt: Ketosynthase- (KS), Acyltransferase- (AT) und Acyl-Carrier-Protein-Domäne (ACP). Im Unterschied zu vielen bakteriellen PKS-Enzymkomplexen werden bei den fungalen keine Methylmalonyl-Einheiten zur Kettenverlängerung genutzt (Schümann & Hertweck, 2006).

Aufgrund des Aufbaus und der Funktionsweise können fungale PKS in zwei Subklassen unterteilt werden: *non-reducing* und *reducing* (Bingle et al., 1999; Nicholson et al., 2001). Die nicht-reduzierenden (NR) bzw. aromatischen PKS (WA-Typ; Mayorga & Timberlake, 1992) synthetisieren Verbindungen ohne chemische Reduktion im Molekül. Dieser fungale PKS-Subtyp ist in die Bildung von verschiedenen Pigmenten (Mayorga & Timberlake, 1992), Melanin oder Aflatoxin involviert. Im Gegensatz dazu spielen die reduzierenden PKS (MSAS-Typ, Beck et al., 1990) mit entsprechenden Domänen (z. B. β -Ketoacylreduktase, Dehydratase oder Enoylreduktase) bei der Bildung von Molekülen mit diversen reduzierten Bereichen eine Rolle. Solche reduzierenden Domänen können z.B die Reduktion einer Keto- zu einer Hydroxygruppe, von Enoyl- zu Alkylgruppen oder Dehydratationen (Hydroxy- zu einer Enoylgruppe) katalysieren (Amnuaykanjanasin et al., 2005).

Die Untersuchung von konservierten PKS-Motiven ermöglicht nicht nur Einblicke in funktionelle sondern auch in systematische bzw. evolutionäre Zusammenhänge. Kroken et al. (2003) konnten durch phylogenetische Analysen mit den konservierten Motiven der

KS-Domäne Zusammenhänge zu Reduzierungsmustern (*reducing*, *non-reducing* PKS) der Typ-I-PKS aufzeigen.

Um mögliche Gen-Cluster einer Polyketid-Synthase der Rubelline finden zu können, wurden erste molekularbiologische Untersuchungen mit degenerierten Primern durchgeführt. Hierbei fanden Primersequenzen aus Amnuaykanjanasin et al. (2005) und Bingle et al. (1999) bzw. Nicholson et al. (2001) Anwendung, welche unter anderem Motive der β -Ketoacyl-Synthase-Gene erkennen. Dieses Enzym ist essentiell im PKS- und im FAS-Komplex vertreten und eignet sich zur Lokalisierung der minimalen PKS-Cluster-Bereiche.

Es wurden verschiedene degenerierte Primer-Kombinationen an genomischer DNA aus *R. collo-cygni* (Stamm 43/3) und *R. uredinicola* getestet. Die Kombinationen KAF1/KAR1 an *R. uredinicola* und KAF1/KAR2 an *R. collo-cygni* erbrachten Ampflifikate der richtigen Größenordnung (~700 bp und größer, Abbildung 3.26). Die Fragmente wurden kloniert und sequenziert. Dabei konnten zwei PKS-Gene für *R. uredinicola* und fünf unterschiedliche PKS-Gene für die sechs charakteristischen PCR-Produkte nach einer BLASTx-Suche identifiziert werden (siehe Anhang Tabelle A.18).

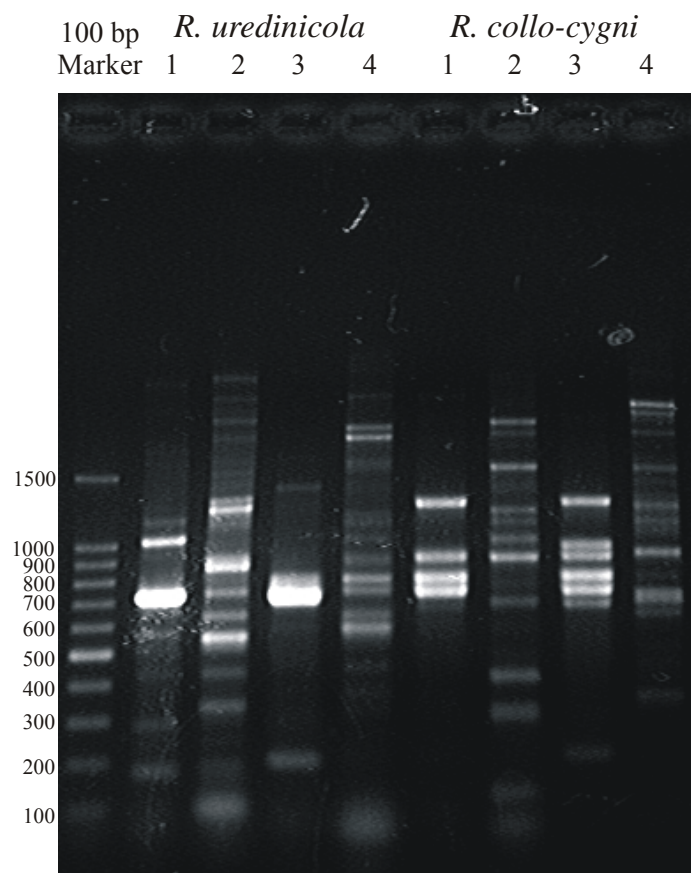


Abbildung 3.26: Agarosegel nach PCR mit genomischer DNA von *R. uredinicola* und *R. collo-cygni* mit folgenden Primer-Kombinationen: Spur 1 (KAF1/KAR1), Spur 2 (KAF2/KAR1), Spur 3 (KAF1/KAR2), Spur 4 (KAF2/KAR2).

Es bleibt momentan noch spekulativ, ob weitere unterschiedliche PKS-Gene für die verbleibenden PCR-Produkte (siehe Banden im Gelbild, Abbildung 3.26) nachgewiesen werden können. Mit zunehmender Größe der PCR-Produkte konnten bei den PKS-Genen von *R. collo-cygni* bis zu vier mögliche Introns gefunden werden (siehe Anhang A. VIII). Die exakte Bestimmung der Introns bleibt allerdings Analysen auf Transkriptionsebene vorbehalten. Nach Entfernen der Introns wurden die AS-Sequenzen (Größen von 232 - 270 AS) mit bekannten PKS-Sequenzen aligniert und phylogenetisch analysiert. Dabei gruppieren sich die Sequenzen in von Kroken et al. (2003) charakterisierten *clades* (Abbildung 3.27). Erste Ergebnisse aus den erhaltenen konservierten Motiven der amplifizierten KS-Domäne im *Neighbor-Joining*-Dendrogramm weisen auf eine Zuordnung in die Hauptgruppe der *Fungal-reducing*-PKS-Gene hin. Der Grundaufbau dieser Multienzymkomplexe beinhaltet folgende Enzym-Domänen: KS-AT-DH-KR-PP. Die weitere Unterscheidung erfolgt anhand bestimmter variabler Domänen, wie z. B. dem evolutiven Verlust der ER-Domäne und dem gleichzeitigen Zugewinn eines nichtribosomalen Enzymkomplexes verschiedener Domänen (*reducing clade* II). Zum anderen ist der Verlust einer ME-Domäne ein weiteres Kriterium (Kroken et al., 2003).

Betrachtet man die erhaltenen Sequenzen im Vergleich zu verwendeten Motiven bei Kroken et al. (2003) bzw. Amnuaykanjanasin et al. (2005), so wird aus Abbildung 3.27 (*Neighbor-Joining*-Dendrogramm) deutlich, dass die Sequenz 3cc dem *reducing-clade* I und 1u dem *reducing-clade* III zugeordnet werden kann. Während weitere vier Sequenzen (2u, 1cc, 2cc und 4cc), sowohl von *R. collo-cygni* als auch von *R. uredinicola*, dem cluster ohne ME-Domäne (*reducing clade* II) zuzuordnen sind. Diese Domäne ist u. a. an der Biosynthese von Nonaketid-Einheiten beteiligt. Zu den Nonaketiden gehörten unter anderem die Tetracycline, die eine strukturelle Homologie zu Chinonen besitzen. Da es weiterhin bei der Biosynthese von monomeren Anthrachinonen (z. B. Chrysophanol) zur Bildung von Octaketiden kommt, ist es naheliegend und nachvollziehbar, dass die molekularen Grundstrukturen der aktiven Enzym-Domänen Analogien zum *reducing clade* II aufzeigen. Die Sequenz 5cc konnte aufgrund der schwer zu lokalisierenden Intron-Sequenzen und der relativ großen Sequenzfolge (1234 bp) keinem bekannten Cluster zugeordnet werden. Trotz der Aufspaltung des *clades* I in drei Teilgruppen und den relativ niedrigen *Bootstrap*-Werten (nur > 50 dargestellt), konnten bei den hier durchgeführten Analysen die von Kroken et al. (2003) beschriebenen Gruppierungen reproduziert werden.

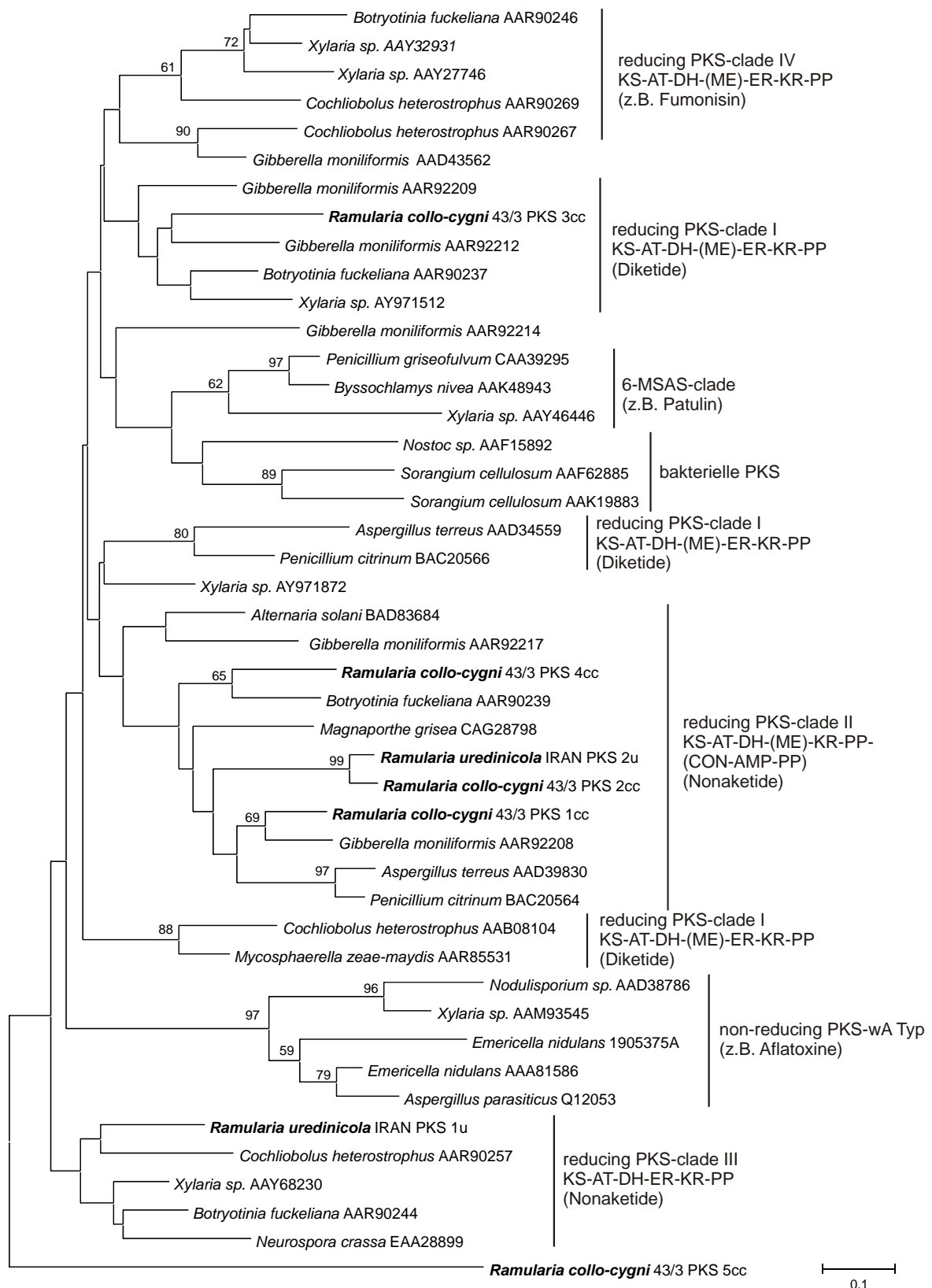


Abbildung 3.27: *Neighbor-Joining*-Dendrogramm der KS-Motive (KAF und KAR-Primer) im Vergleich mit Sequenzen aus Amnuaykanjanasin et al. (2005). Datengrundlage bildet eine Alinierung der KS-Domäne mit 138 Alignmentpositionen. Das Dendrogramm wurde über 2000 *Bootstrap*-Replikate (*poisson correction* und *uniform rates*) verifiziert, die Werte über den Ästen geben die prozentuale Häufigkeit in den Replikaten an. Die in dieser Arbeit amplifizierten PKS-Fragmente aus *R. collo-cygni* und *R. uredinicola* sind fett dargestellt.

Die hier dargestellte Untersuchung gibt somit einen ersten Hinweis auf beteiligte Enzymdomänen, die an der Biosynthese von Polyketiden und damit vermutlich der Rubelline beteiligt sein können.

Weitere Untersuchungen mit degenerierten Primern der LC-Reihe aus Bingle et al. (1999) bzw. Nicholson et al. (2001) erbrachten zu viele unspezifische PCR-Banden (Primer LC3/5c) oder zeigten eine zu geringe Variabilität der Fragmente (LC1/2c). Somit wurden diese Primer für weitere Untersuchungen nicht verwendet.

Um hinsichtlich der Minimal-PKS der Rubelline detaillierte Aussagen treffen zu können, wären z. B. *Knockout*-mutanten erforderlich. Mit den amplifizierten und sequenzierten Fragmenten wurde allerdings eine Grundlage für weitere molekularbiologische Untersuchungen geschaffen. Da die Bildung der Rubelline lichtinduziert erfolgt, sollten weiterführende Experimente auf Genexpressionsebene im Beleuchtungsversuch bzw. unter Lichtausschluss erfolgen. Dadurch könnte ermittelt werden, welche der mit degenerierten Primern aus genomischer DNA amplifizierten Fragmente unter Lichteinfluss exprimiert werden und im Zusammenhang mit der Rubellin-Biosynthese stehen.

3.8 Rubellin-Nachweis *in vivo*

Bei den hier untersuchten Proben handelte es sich um nativ befallenes Blattmaterial mit typischer *Ramularia*-Symptomatik. Aus diesen Blättern konnten die Hauptverbindungen Rubellin A - D nachgewiesen werden (Tabelle 3.13). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch in Blättern mit nativ roter Nekrosenumrandung (Abbildung 3.28), d. h. ohne Zwischenbehandlung mit der Saueragar-Methode von Tschöpe & Sachs (2001), Rubelline zum Teil in erheblichen Mengen nachweisbar sind.

Rubellin B stellt mit $2 - 6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ die Hauptverbindung dar. Die Konzentrationen von Rubellin C und D liegen in Größenordnungen von $< 1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Ähnliche Mengenverhältnisse sind auch in den Untersuchungen zur Kinetik (siehe Kapitel 3.4) detektiert worden.

Der *In-Vivo*-Nachweis der Verbindungen unterstreicht die Bedeutung für den Infektionsverlauf und die damit verbundene Symptomausprägung von *R. collo-cygni*. Es konnte gezeigt werden, dass die Verbindungen, die der Pilz auf synthetischen Medien erzeugt, eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der RLSD spielt. Über die Bedeutung der Rubelline beim Invasionsprozess kann jedoch nur spekuliert werden.

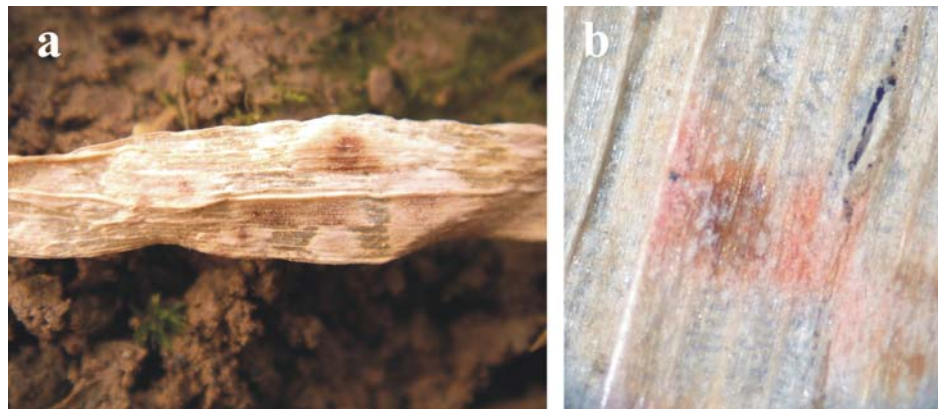


Abbildung 3.28: Blattmaterial von *H. vulgare* (Lambach, Österreich) (a); Nekrose mit nativ roter Umrandung (b) (*H. vulgare*, Lambach, Österreich).

Tabelle 3.13: Nachweis der vier Hauptverbindungen (Rubellin A - D) in den infizierten Blättern verschiedener Wirtspflanzen.

Nr.	Herkunft	Wirt	Rubellin A [µg/cm ²]	Rubellin B [µg/cm ²]	Rubellin C [µg/cm ²]	Rubellin D [µg/cm ²]
1	Wetze, Niedersachsen	<i>Hordeum vulgare</i>	n.n.	1,90	< 0,01	0,40
2	Marchtrenk, Oberösterreich	<i>Hordeum vulgare</i>	n.n.	1,60	< 0,01	0,20
3	Loitersdorf, Bayern	<i>Hordeum vulgare</i>	0,08	5,91	n.n.	0,18
4	Wehen, Niedersachsen	<i>Hordeum vulgare</i>	< 0,01	1,97	n.n.	0,13
5	Uffenheim, Bayern*	<i>Hordeum vulgare</i>	n.n.	3,10	< 0,01	0,20
6	Linden, Oberösterreich	<i>Triticum aestivum</i>	0,03	0,12	0,02	0,08
7	Schwanenstadt, Oberösterreich	<i>Agropyron repens</i>	n.n.	0,01	n.n.	0,01
8	Lambach, Oberösterreich*	<i>Hordeum vulgare</i>	n.n.	0,01	< 0,01	< 0,01
9	Lambach, Oberösterreich	<i>Avena sativa</i>	0,10	1,51	0,25	1,10
10	Stjordal, Norwegen	<i>Hordeum vulgare</i>	n.n.	< 0,01	n.n.	< 0,01
11	Luzany, Tschechien	<i>Hordeum vulgare</i>	n.n.	< 0,01	n.n.	< 0,01

* Blattmaterial mit nativ roten Flecken

3.9 Untersuchungen zur Biosynthese

Die Biosynthese der Anthrachinone kann auf zwei grundlegende Mechanismen zurückgeführt werden. Zum einen der seltenere Rubiadin- bzw. Alizarin-Typ, welcher bisher nur in einer bestimmten taxonomischen Gruppe von Pflanzen, den *Tubiflorae* (Bsp. *Rubia tinctorum*) beschrieben wurden (Han et al., 2001). Hierbei spielen mehrere biochemische Prozesse eine Rolle. Während dem chinoiden Mittelring α -Ketoglutarat als Vorstufe zu Grunde liegt, werden die benachbarten phenolischen Ringsysteme über den Shikimisäure-Biosyntheseweg (Chorismat, Isochorismat) bzw. den Terpenoid-Weg biosynthetisiert. Der zweite und weitaus häufigere Mechanismus ist der Polyketid-Weg, der durch den sogenannten Emodin-Typ repräsentiert wird und bei Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren (Luckner, 1990; Gill, 2001) anzutreffen ist. Bei diesem Bildungstyp wird das Anthrachinon-Grundmolekül vollständig aus Acetyl- bzw. Malonyl-Einheiten über die zwischenzeitlich synthetisierte Octa- β -Ketoacyl-Kette aufgebaut.

In ersten Fütterungsexperimenten mit radioaktiv markierten Isotopen zu verschiedenen Zeitpunkten sollte ein möglicher Präcursor für weitere Untersuchungen gefunden werden. Weiterführend sollten mittels ^{13}C -markierter Vorstufen Aussagen zum Biosyntheseweg von Rubellin D und B als Hauptmetabolite abgeleitet und abschließend das zu Grunde liegende Faltungsmuster nachgewiesen werden.

In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass *R. collo-cygni* einen Zusatz von 2 g Natriumacetat pro Liter Medium toleriert. Es waren normales Wachstum und die in Art und Umfang übliche Rubellin-Produktion zu verzeichnen. Nach Fütterung von radioaktiv markiertem Acetat ($[1-^{14}\text{C}]$ -Acetat) als möglichem Präcursor konnte eine absolute Einbaurate von 2,5 % bei Rubellin D bzw. 0,7 % bei Rubellin B festgestellt werden (Tabelle 3.14). Der verringerte Wert für die zweite Verbindung kann durch die geringe absolut produzierte Menge erklärt werden. Wie bereits beschrieben, wird offensichtlich erst Rubellin B biosynthetisiert. Während der Fermentation findet dann eine nicht-enzymatische, pH-Wert-abhängige (alkalisches Milieu) Umsetzung zu Rubellin D statt. Aus diesem Grund wurde in den weiterführenden Experimenten zur Stabilisierung und Erhöhung der Ausbeute an Rubellin B ein Sörensen-Phosphatpuffer-Medium (pH 5,4) verwendet. In ungepuffertem Czapek-Thom-Medium steigt der pH-Wert über einen Kultivierungszeitraum von 21 Tage von 5,4 auf 8,5 an, die Umwandlung zu Rubellin D wird daher mit fortschreitender Fermentationsdauer intensiviert.

Tabelle 3.14: Einbau von $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetat in Rubellin B und D. Dargestellt sind die spezifischen Einbauraten (a - bezogen auf C-Atome; b - bezogen auf biosynthetische Einbauwahrscheinlichkeit bei Fütterung von $[1-^{14}\text{C}]$ -markiertes Natriumacetat) und die absoluten Einbauraten (in KF + Mycel) zu den jeweiligen Fütterungszeitpunkten (nach 1 und 9 Kulturtagen).

	spezifische Einbaurate a [%]		spezifische Einbaurate b [%]		absolute Einbaurate [%]	
	Kulturtag 1	Kulturtag 9	Kulturtag 1	Kulturtag 9	Kulturtag 1	Kulturtag 9
Rubellin B	0,28	0,39	0,60	0,84	2,48	3,75
Rubellin D	0,50	0,33	1,07	0,71	0,68	0,43

Nach Fütterungsversuchen in zwei unabhängigen Ansätzen, jeweils mit $[1-^{13}\text{C}]$ - und $[2-^{13}\text{C}]$ -Natriumacetat und anschließender Isolation von Rubellin B und D konnte durch das erhaltene Einbaumuster (Abbildung 3.29) eindeutig belegt werden, dass die Rubelline über den Polyketid-Weg biosynthetisiert werden (prozentuale Einbauraten siehe Anhang Tabelle A.9).

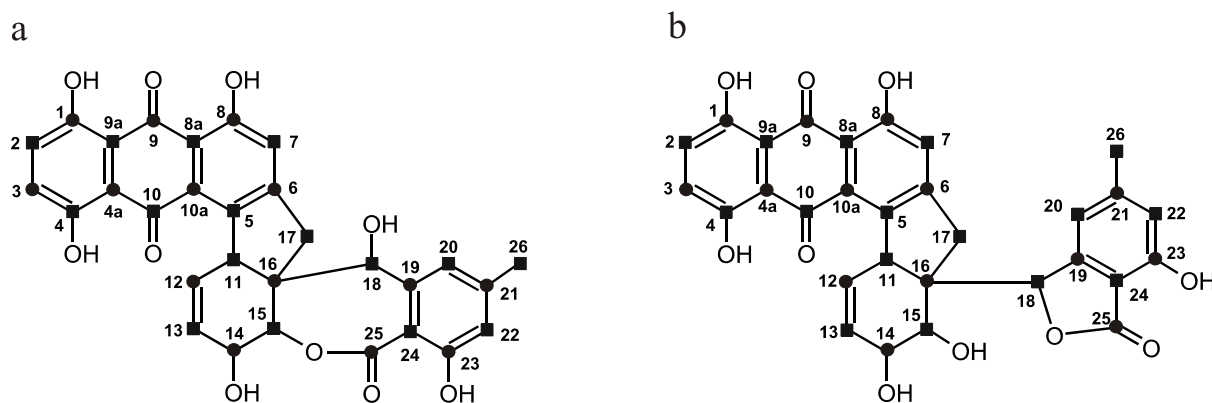


Abbildung 3.29: Muster des Einbaus von $[1-^{13}\text{C}]$ -Acetat (●) bzw. $[2-^{13}\text{C}]$ -Acetat (■) in Rubellin B (a) und Rubellin D (b).

In diesem Zusammenhang war ein weiteres bemerkenswertes Ergebnis zu verzeichnen. Durch die Fütterung von $[1-^{13}\text{C}]$ -markiertem Acetat blieben die ^{13}C -Signale der unmarkierten C-Atome auf einem normalen Niveau von knapp über 1,1 % (bedingt durch Umbauprozesse im Tricarbonsäure-Zyklus). Nach Fütterung der zweiten, an C-2 markierten Acetatvorstufe konnten jedoch Einbauraten von 4 - 5 % an den Positionen der unmarkierten C-Atome im Molekül beobachtet werden (siehe Tabelle A.9 im Anhang). Dies bedeutet, dass es eine Umwandlung bzw. Reorganisation des Markierungsmusters im eingesetzten $[2-^{13}\text{C}]$ -Acetat stattfindet. Offensichtlich wird die markierte Methylgruppe, zumindest teilweise, in eine Carboxylgruppe umgebaut. Eine solche Konversion ist nur durch einen *protein turnover*, in diesem Falle den anschließenden Auf- und Umbau der Aminosäure Lysin, möglich (Abbildung 3.30).

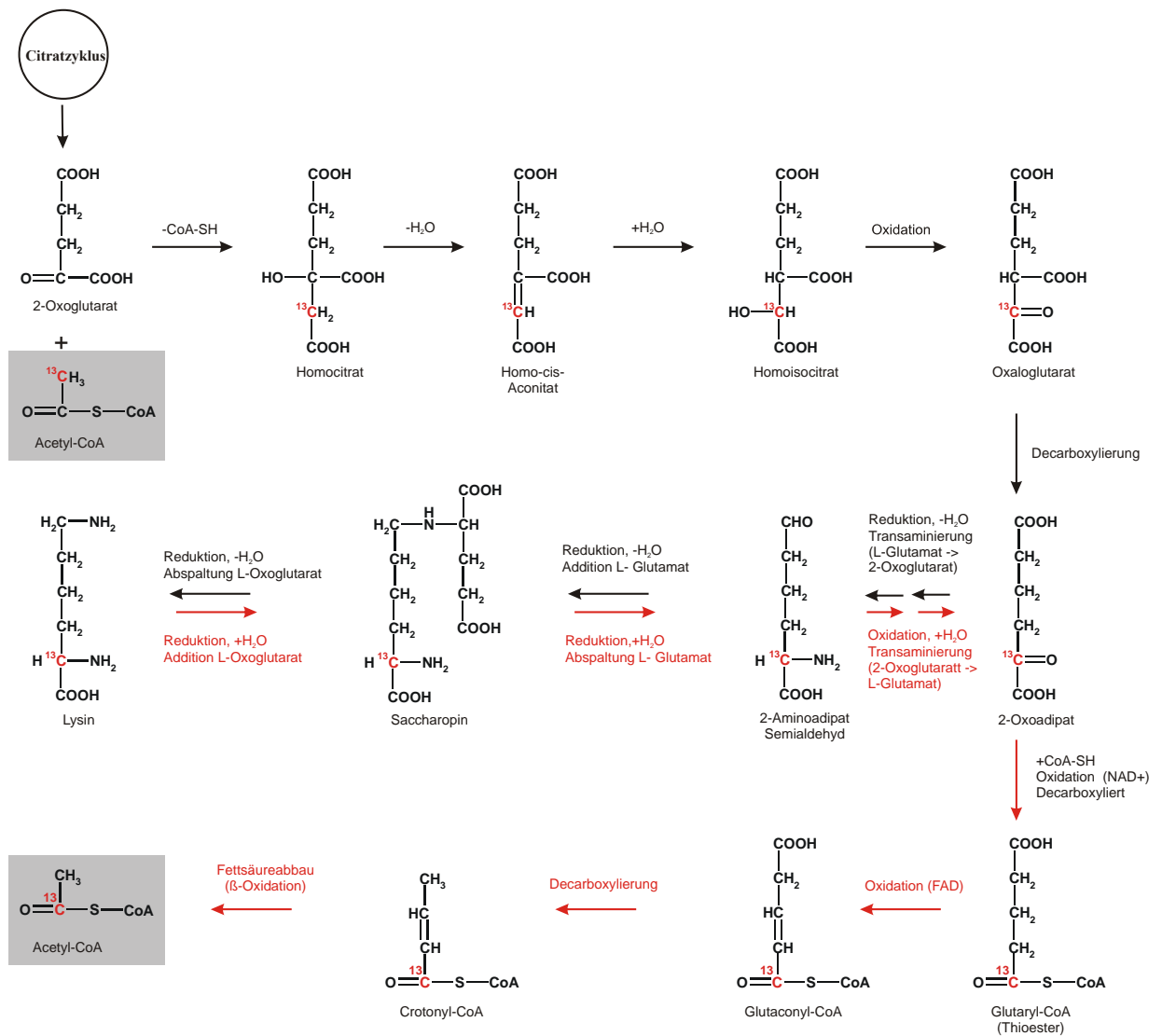


Abbildung 3.30: Lysin-Biosynthese (schwarze Pfeile) mit anschließendem Abbau zu Acetyl-CoA (rote Pfeile). Die $[1-^{13}\text{C}]$ -Markierung im eingesetzten Acetat bzw. Acetyl-CoA ist ebenfalls rot hervorgehoben (verändert nach Michal, 1999).

Die Strukturformeln von Uredinorubellin I und II lassen vermuten, dass sie aus zwei Anthrachinon-Grundbausteinen in Form eines daraus resultierenden Dimers (Bianthrachinon) aufgebaut werden (Kapitel 3.2.3). Das Einbaumuster in Rubellin B zeigt deutlich, dass zwei Oktaketid-Einheiten in die Biosynthese involviert sein müssen (Abbildung 3.29). Helminthosporin (1,5,8-Trihydroxy-3-methylantra-9,10-chinon) und Chrysophanol (1,8-Dihydroxy-3-methylantra-9,10-chinon), welche unter anderem als Sekundärmetabolite aus phytopathogenen Pilzen beschrieben (*Drechslera holmii* (LUTTRELL) SUBRAMANIAN & JAIN bzw. *D. ravenelii* (M.A. CURTIS) SUBRAM. & B.L. JAIN; Van Eijk & Roeymans, 1981) und in den untersuchten Organismen nachgewiesen werden konnten (siehe Kapitel 3.6), könnten als derartige Vorläufer-Monomere angesehen werden.

Die weiteren Umwandlungsprozesse bis zur Lactonstruktur von Rubellin A bzw. B im unteren Teil des Moleküls finden wahrscheinlich Enzym-katalysiert statt. Biochemisch könnte es sich um eine sogenannte Baeyer-Villiger-Oxidation handeln (siehe auch Kapitel 3.2.3), bei der ein Sauerstoffatom in eine Ringstruktur eingebaut wird (Wright et al., 1996; Garcia-Urdiales et al., 2005). Derartige Biotransformationsreaktionen von aliphatischen oder zyklischen Ketonen in Bakterien bzw. Pilzen durch Monooxygenasen wurden bereits beschrieben (Andrade et al., 2004; Mihovilovic et al., 2002). In der Biosynthese beispielsweise von Aflatoxinen spielt dieser Reaktionsmechanismus ebenfalls eine Rolle (Henry & Townsend, 2005). Als wahrscheinlicher ist jedoch der Mechanismus der Acylwanderung bzw. der intramolekularen Acylierung einzustufen (Gritsan & Klimenko, 1993) und es würde ebenfalls zu einer Ringerweiterung zu einem 7-gliedrigem Lactonring führen. Diese Annahme stützt sich darauf, dass die bei den Uredinorubellinen in Position C-15 vorhandene Hydroxygruppe bei Rubellin A bzw. B fehlt. Bei einer Baeyer-Villiger-Oxidation müsste diese funktionelle Gruppe auch bei den Folgeprodukten nachweisbar sein. Eine Zusammenfassung über die Biosynthese-Prozesse der Rubelline gibt Abbildung 3.32.

Um nun abschließend Aussagen über das entsprechende Faltungsmuster der Poly- β -Keto-Acylkette als Präcursor der Anthrachinone machen zu können, wurden Fütterungsexperimente mit uniform-markierter Glucose durchgeführt. [U- $^{13}\text{C}_6$]-Glucose wurde mit unmarkierter Glucose auf einen Gehalt von 4 % eingestellt (Verminderung der Wechselwirkung bei der NMR-Messung; Liebermann et al., 2001) und der Fermentation von *R. collo-cygni* zugeführt. Nach Einbau von [1, 2- $^{13}\text{C}_2$]-Acetat, metabolisiert aus Glucose *via* Glycolyse über Pyruvat, konnte durch die intakt gebliebenen Acetateinheiten das ^{13}C - ^{13}C -Kopplungsmuster für die Hauptverbindungen Rubellin B und D bestimmt werden (Daten siehe Anhang Tabelle A.10). Pilze und Streptomyceten nutzen zwei unterschiedliche Strategien zur Faltung der Poly- β -Keto-Acylketten. Entscheidend für die Unterscheidung dieser Mechanismen ist die Anzahl eingebauten intakter C-2-Acetat-Einheiten in den initialen Cyclohexanring im zyklisierten Polyketid. Während bei Streptomyceten drei Einheiten eingebaut werden (*Folding-S-Mode*), sind es bei Pilzen zwei intakte Acetat-Einheiten (*Folding-F-Mode*) (Thomas, 2001). Hierbei muss angemerkt werden, dass der *Folding-F-Mode* für höhere Eukaryoten (Bsp. *Kniphofia uvaria* (L.) HOKEN (Asphodelaceae) oder *Galeruca tanacetii* L. (Chrysomelidae)), der *Folding-S-Mode* bisher jedoch nur für Prokaryoten (Bsp. *Nocardia*, Actinomycetes), u. a. über die in allen genannten Organismen biosynthetisierte Verbindung Chrysophanol, nachgewiesen werden konnte (Bringmann et al., 2006; 2007). Abbildung 3.31 zeigt deutlich, dass sich nur zwei intakte C-2-Einheiten im entsprechenden Initial-Ring der beiden Anthrachinon-

Grundmoleküle (C-1/C-2 bzw. C-3/C-4 im oberen Teil und C-11/C-12 bzw. C-13/C-14 im unteren Teil) befinden. Zusammenfassend konnte zweifelsfrei der *Folding-F-Mode* für die Rubelline nachgewiesen werden.

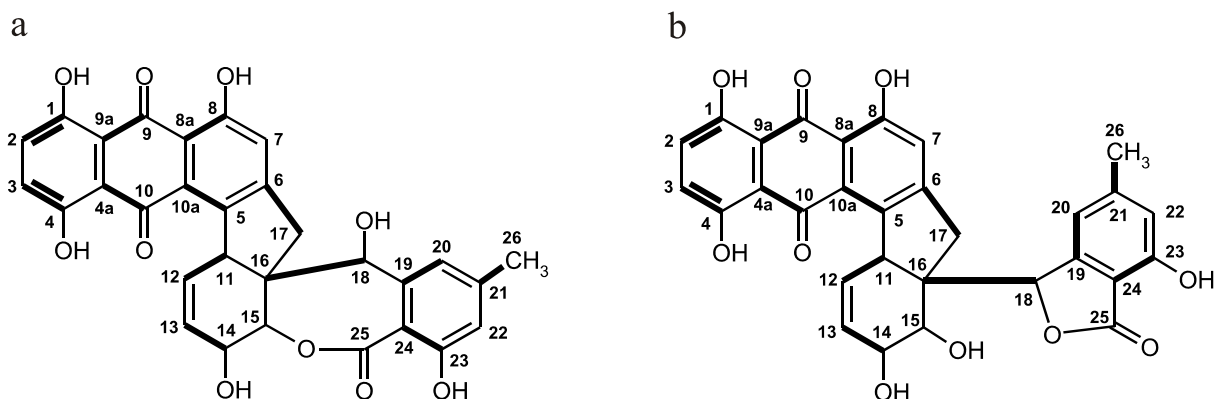


Abbildung 3.31: Einbau- bzw. Faltungsmuster nach Fütterung von $[U-^{13}C_6]$ -Glucose (4 % (w/w)) in Rubellin B (a) und Rubellin D (b). Die verdickt dargestellten Bindungen geben die jeweils miteinander koppelnden Kohlenstoffatome an.

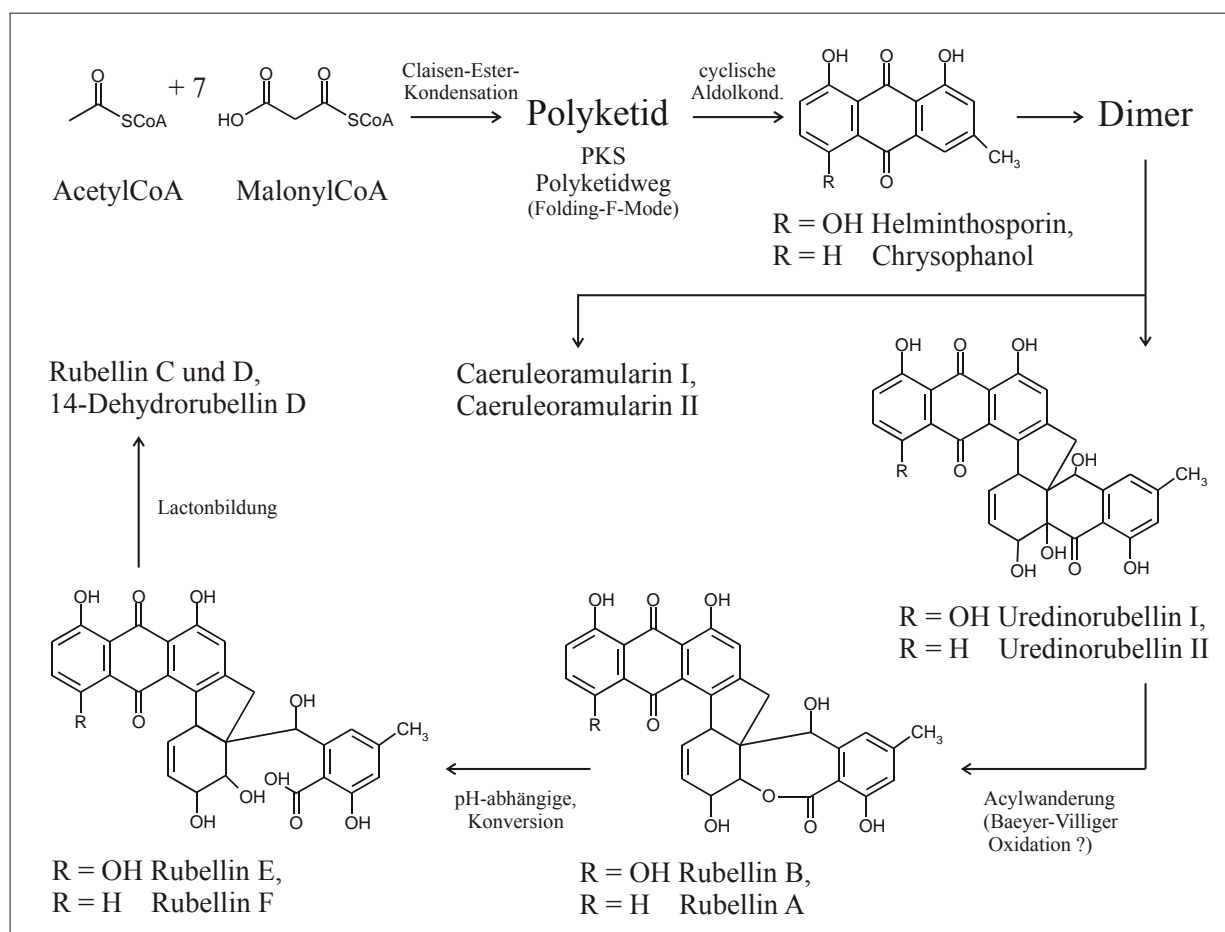


Abbildung 3.32: Übersicht zur Rubellin-Biosynthese.

3.10 Biologische Aktivität

Anthrachinone repräsentieren eine Substanzklasse, die sich durch eine Vielzahl von biologischen Wirkungen auszeichnet. Auf der Suche nach neuen medizinischen Anwendungen von Naturstoffen werden sie daher oft in umfassenden biologischen Untersuchungen hinsichtlich ihres Wirkpotentials getestet. In vorderster Front steht dabei natürlich die Aufklärung des Wirkmechanismus der jeweiligen Verbindung und damit verbunden ihrer Wirkung als wirtsspezifisches oder wirtsunspezifisches Toxin. Im Rahmen dieser Arbeit wurden biologische Wirkungen von Rubellinen in verschiedenen Assays untersucht. Zum einen wurde die Wirkung der isolierten Reinstoffe direkt an der Wirtspflanze von *R. collo-cygni* (*H. vulgare*) erfasst (eventuelle Beteiligung an der Induktion von RLSD-Symptomen). Zum anderen kamen *In-Vitro*-Testsysteme bei Untersuchungen zur photodynamischen Aktivität zum Einsatz. Weiterhin wurden die antibiotische Aktivität gegen ausgewählte Mikroorganismen, mögliche antivirale Effekte, eine potentielle Beeinflussung der Aggregation des für die Pathogenese von Morbus Alzheimer diskutierten Tau-Proteins sowie abschließend in Proliferations- und Zytotoxizitätstests Einflüsse auf verschiedene humane und Säugerzelllinien untersucht.

3.10.1 Bioassay an *Hordeum vulgare* L.

Mit diesem Testsystem wurde die Ausbildung der typischen RLSD-Symptomatik durch Rubelline untersucht. Die Rubelline B, D und E wurden somit auf ihre Fähigkeit getestet, die gleiche Symptomausprägung an Gerstenpflanzen zu induzieren, wie das Pathogen *R. collo-cygni* (Tabelle 3.15). Es war jedoch eine starke Schwankung der Messwerte zu verzeichnen. Obwohl auf Grund dessen keine klaren Dosis-Wirkungsbeziehungen ersichtlich wurden, konnten Effekte der Einzelverbindungen an der Wirtspflanze doch eindeutig nachgewiesen werden. Die identische Ausprägung der Nekrosen an der Wirtspflanze zeigt, dass die isolierten Verbindungen an der Symptomausprägung und somit der Etablierung des Pathogens beteiligt sind. Erste Hinweise auf eine lichtabhängige Wirkung der Rubelline sind in Saugversuchen (Abbildung 3.33) deutlich geworden. Während Rubellin B in einer Konzentration von 300 µM mit Beleuchtung nekrotische Blattsegmente ausbildete, zeigten sich bei der gleichen Konzentration in der Dunkelkontrolle keine nennenswerten Verbräunungen.

Parallel zu den Saugversuchen an der Wirtspflanze *H. vulgare* wurden Inokulationsversuche an Blättern von *Nicotiana tabacum* L. durchgeführt. Hierbei konnten ähnliche Symptome, wie Nekrosen und Chlorosen, beobachtet werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Insgesamt erhärten diese Ergebnisse den Verdacht, dass es sich um nicht-wirtsspezifische Toxine handelt.

Tabelle 3.15: Dosis-Wirkungsbeziehung der Rubelline B, D und E an Blättern von *H. vulgare*. Dargestellt ist die prozentuale nekrotische Blattfläche in Beziehung zur jeweiligen Toxin-Konzentration. (n.u. - nicht untersucht)

mg/Ansatz	nekrotisierte Blattfläche [%]		
	Rubellin B	Rubellin D	Rubellin E
1,00	n.u.	6,4 ± 4,9	19,7 ± 8,7
0,75	2,8 ± 1,6	5,1 ± 5,0	18,0 ± 4,2
0,50	2,3 ± 1,3	5,4 ± 4,0	6,2 ± 5,1
0,25	2,2 ± 1,3	5,0 ± 4,3	7,7 ± 4,4
0,10	n.u.	2,7 ± 2,2	4,1 ± 2,6
0,00	0,0	0,0	0,0

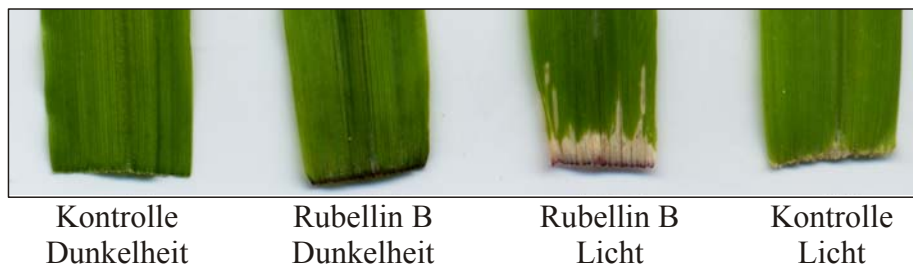


Abbildung 3.33: Saugversuch mit Rubellin B (300 µM; 6,7 % Methanol). Die Gerstenblätter (Sorte Gunda) wurden für 3 h in Untersuchungslösung gehalten und nach Überführung in Wasser für 2 Tage im Licht bzw. in der Dunkelheit inkubiert.

3.10.2 Photodynamische Aktivität

Bei einigen nicht-wirtsspezifischen fungalen Phytotoxinen ist deren Toxizität auf die Aktivierung von Sauerstoff zurückzuführen. Verschiedene Phytotoxine sind in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) im infizierten Pflanzengewebe zu generieren, wodurch es neben einer Schwächung des Wirtes zum Auftreten chlorotischer und nekrotischer Symptome kommt.

Bei diesen Aktivierungsreaktionen kann das Toxin physikalisch durch Lichteinstrahlung angeregt werden. Es überträgt die Anregungsenergie in einer photodynamischen Reaktion des Typs II auf Luftsauerstoff und führt somit zu einer Energieniveauänderung vom $^3\text{O}_2$ zu $^1\text{O}_2$. Der entstandene Singulett-Sauerstoff reagiert im Unterschied zu atmosphärischem Sauerstoff aufgrund seiner Spinänderung sehr schnell mit den meisten organischen Verbindungen, speziell mit Doppelbindungen, und erzeugt Hydroperoxide (Heiser et al., 1998, Aguirre et al., 2005). Bei einer weiteren Form der photodynamischen Reaktionen erfolgt keine physikalische Übertragung von Anregungsenergie, sondern eine Ladungstrennung innerhalb des angeregten Pigments. Bei dieser photodynamischen Reaktion vom Typ I (Elstner, 1982) wird ein Elektron vom angeregten Toxin auf Sauerstoff übertragen und es entsteht ein Superoxidradikalanion

($O_2^{\cdot -}$). Aufgrund ihrer hohen Reaktivität können ROS u. a. zur Pathogenität fungaler Krankheitserreger beitragen.

Wie bereits in früheren Arbeiten für das aus *M. rubella* bekannte Rubellin A belegt werden konnte, sind Anthrachinon-Derivate dieses Typs offensichtlich zur Generierung von Radikalen befähigt (Arnone et al., 1988; Aminian-Saghafi et al., 1992). Die photodynamische Wirksamkeit von Rubellin A betrug hier jedoch nur 40 % der von Cercosporin, einem sehr gut untersuchten Photosensitizer aus phytopathogenen *Cercospora*-Arten (Assante et al., 1977). Der Wirkmechanismus von Cercosporin beruht zum einen auf einer photodynamischen Reaktion vom Typ II (Youngman et al., 1983), zum anderen wird auch die Reaktion vom Typ I für dieses Toxin beschrieben (Daub & Hangarter, 1983). Auch für einfache Anthrachinone pflanzlichen Ursprungs (z. B. Soranjidol, Rubiadin oder Damnacanthol) sind photodynamische Reaktionen beider Typen beschrieben worden (Montoya et al., 2005).

Heiser et al. (2003) beschrieben in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe den grundlegenden Wirkmechanismus von Rubellin D (Abbildung 3.34) und bestätigten somit die photodynamische Aktivität der Rubelline in zwei Testsystemen. Im ersten System erfolgte die Inkubation von Rubellin D zusammen mit α -Keto-4-Thiomethylbuttersäure (KMB), welches durch die Einwirkung von ROS unter Bildung von Ethylen fragmentiert. Dies war nur unter Lichteinfluss nachweisbar, bei einer Inkubation im Dunkeln konnte kein Ethylen nachgewiesen werden. Versuche mit Radikalfängern, wie z. B. Superoxiddismutase, Katalase und dem Singulett-Sauerstoff-Quencher Diazabicyclooctan, wiesen mit einer überwiegenden Bildung von 1O_2 auf eine photodynamische Reaktion vom Typ II hin, da nur mit Diazabicyclooctan eine signifikante Hemmung der lichtinduzierten KMB-Spaltung erzielt werden konnte. Experimente mit Superoxiddismutase inhibierten die Reaktion nur leicht und verdeutlichten damit die untergeordnete Rolle der Typ-I-Reaktion.

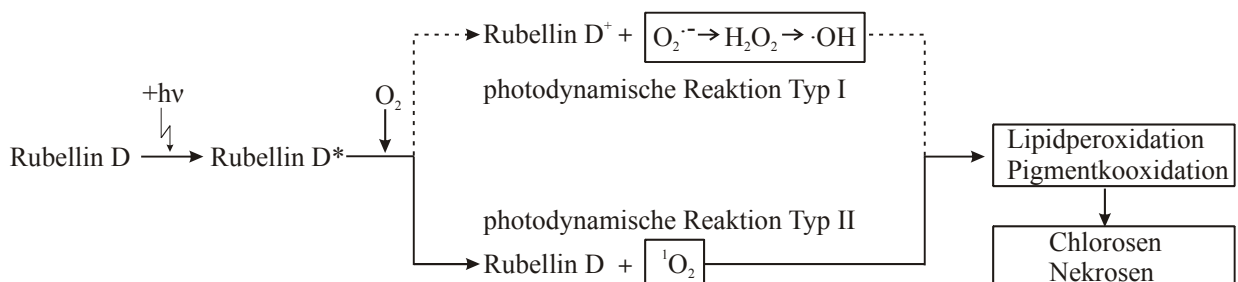


Abbildung 3.34: Photodynamischer Wirkmechanismus der Rubelline am Beispiel von Rubellin D (verändert nach Heiser et al., 2003).

Im zweiten Testsystem konnte nachgewiesen werden, dass Rubelline die Bildung von Ethan aus α -Linolensäure in einer licht-, konzentrations- und zeitabhängigen Reaktion induzieren und somit die Peroxidation ungesättigter Fettsäuren auslösen können.

Mit den beiden parallel eingesetzten *In-Vitro*-Testsystemen wurde in weiteren Untersuchungen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Dr. I. Heiser (TU München-Weihenstephan) die photodynamische Aktivität von weiteren Anthrachinon-Derivaten aus *R. collo-cygni* bzw. *R. uredinicola* nachgewiesen.

In diesen Arbeiten konnten die Ergebnisse aus Arnone et al. (1988) und Heiser et al. (2003) bestätigt und reproduziert werden. Wie Abbildungen 3.35 zeigt, setzten die Rubelline aus α -Linolensäure unterschiedliche Mengen Ethan frei. Rubellin A zeigte in diesem Experiment die höchste photodynamische Aktivität, während Rubellin E als Verbindung mit einem geöffneten Lactonring keine Effekte offenbarte. Die Entstehung von Singulett-Sauerstoff hängt von der Dauer des Triplettzustandes der photodynamisch aktiven Verbindung ab. Da die molekulare Geometrie von Photosensitizern ebenfalls die Stabilität solcher Zustände beeinflusst (Schweitzer & Schmidt, 2003), ist zu vermuten, dass ein solcher Zustand von Rubellin E nur sehr kurze Zeit existent ist und in dem hier verwendeten Testsystem deshalb keine Effekte beobachtet werden konnten.

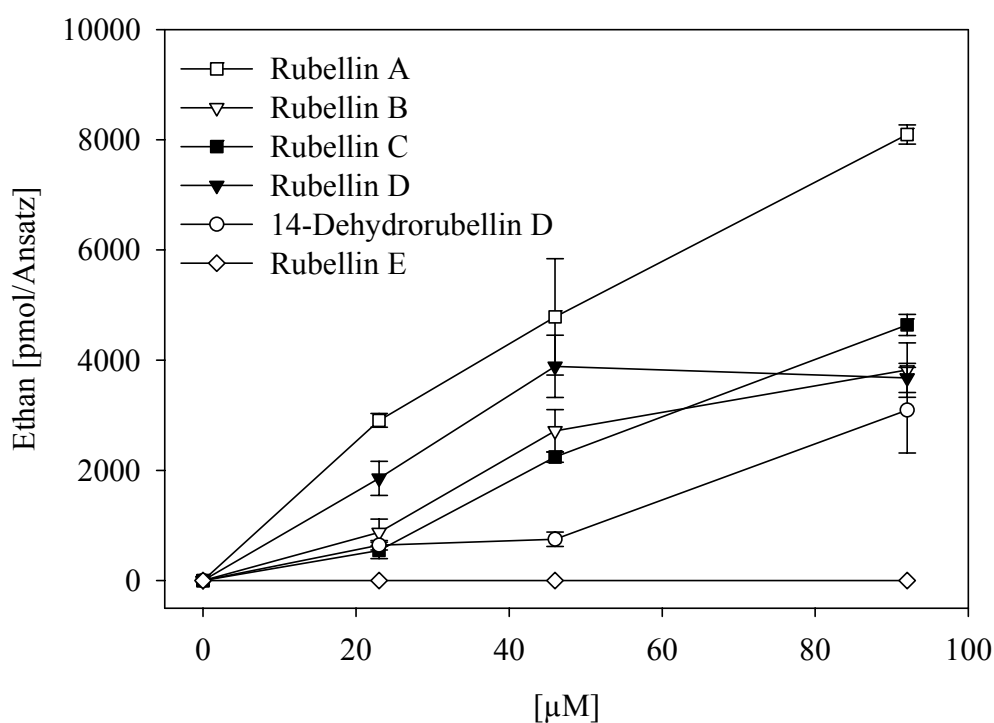


Abbildung 3.35: Ethan-Bildung aus α -Linolensäure nach 60-minütiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Rubellin A, B, C, D, E und 14-Dehydrorubellin D.

Im zweiten Testansatz konnte für alle getesteten Verbindungen, einschließlich Rubellin E, eine Ethylenbildung aus KMB gaschromatographisch nachgewiesen werden (Abbildung 3.37), womit die photodynamische Aktivität der Rubelline als eindeutig nachgewiesen angesehen werden darf. In Abbildung 3.36 ist die Wirkung von Caeruleoramularin I mit seiner ungewöhnlichen Anthracen-9,4-dion-Struktur separat im Vergleich zur strukturell verwandten Verbindung Rubellin B dargestellt. Die photodynamische Aktivität konnte auch hier bestätigt werden. Obwohl die Peroxidation der α -Linolensäure durch Caeruleoramularin I deutlich schwächer induziert wurde als durch Rubellin B (Abbildung 3.36a), zeigten sich im KMB-Testsystem trotz unterschiedlicher Kurvenverläufe vergleichbare Intensitäten (Abbildung 3.36b).

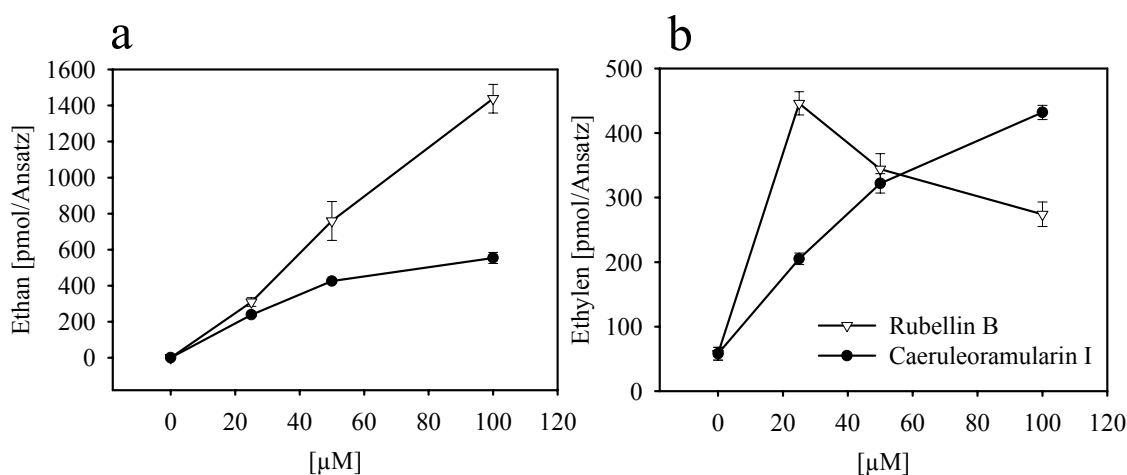


Abbildung 3.36: Photodynamische Aktivität von Caeruleoramularin I im Vergleich zu Rubellin B. a) Ethan-Bildung aus α -Linolensäure nach 60-minütiger Inkubation, b) Bildung von Ethylen aus KMB; jeweils bei unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen.

Zusammenfassend sind folgende Schlussfolgerungen möglich. Die gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies führen zur Peroxidation von Fettsäuren pflanzlicher Membranen, ein Vorgang, der letztendlich zum Absterben der Wirtszelle und zur Nekrotisierung des Gewebes führt. Die nach deutlicher *Ramularia*-Infektion beobachteten Chlorosen können durch die während der Fettsäureperoxidation erfolgte Pigmentkooxidation erklärt werden. Die toxininduzierte Zerstörung der Wirtsmembran erleichtert dem Pilz, den Wirt als Nahrungsquelle zu erschließen oder zumindest so zu schwächen, dass eine Etablierung des Pathogens in der Pflanze ermöglicht wird.

Es können jedoch nur wenige Aussagen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen gemacht werden. Auffällig sind die Verbindungen Rubellin E (mit geöffnetem Lactonring), 14-Dehydro-

rubellin D, die eine zusätzliche Ketogruppe in Position C-14 im Vergleich zu den Rubellinen A - F aufweist und Caeruleoramularin I, die durch Verschiebung einer Ketogruppe im Anthrachinon-Grundkörper des chinoiden Systems charakterisiert ist. Offensichtlich wirken sich alle drei Strukturänderungen negativ auf die photodynamische Aktivität aus.

Die Fähigkeit der Rubelline zur Generierung von ROS und der damit verbundene abgeleitete Wirkmechanismus in Kombination mit analoger Symptomatik an Blättern von *N. tabacum* belegen eindeutig die wirtsunspezifische Wirkung.

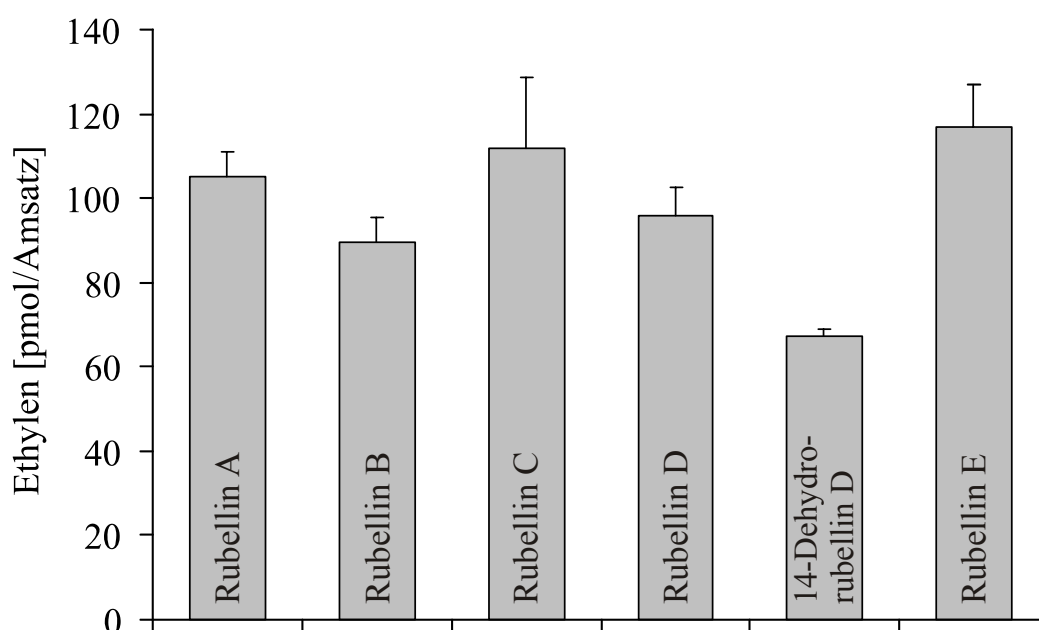


Abbildung 3.37: Bildung von Ethylen aus KMB nach 60-minütiger Inkubation mit 46 µM Testsubstanz (Rubellin A - E und 14-Dehydrorubellin D).

3.10.3 Antibiotische Wirkung

Es existieren zahlreiche Publikationen über antimikrobielle Effekte von Anthrachinon-Derivaten aus Pilzen (Chrysai-Tokousbalides & Kastanlas, 2003), Flechten (Manojlovic et al., 2000), Pflanzen (Levin et al., 1988; Babu et al., 2003; Lenta et al., 2007), oder gar aus Tieren (Pankewitz et al., 2007). Die beschriebene Wirkungsbreite umfasst viele Bakterien- und Pilzarten.

In einem Vorversuch wurden in dieser Arbeit isolierte Verbindungen im Agar-Diffusionstest in zwei Konzentrationen auf ihre antibiotische Wirkung getestet (siehe Anhang Tabelle A.15). Hierbei konnte keine eindeutige Wirkung auf Pilze wie den fakultativ human pathogenen *Sporobolomyces salmonicolor* (FISCHER & BREBECK) KLUYVER & VAN NIEL, auf *Candida albicans* (C.P.ROBIN) BERKHOUT oder auf den Schimmelpilz *Penicillium notatum* WESTLING festgestellt werden. In einem alternativen antimykotischen Testsystem wurde Rubellin D an diversen phytopathogenen Pilzen getestet (siehe Anhang Tabelle A.16), wobei eine Wachstums hemmung auf *Drechslera avenae* (EIDAM) SCHARIF und *Penicillium italicum* WEHMER festgestellt werden konnte ($ED_{50} = 21,6$ bzw. $26,2 \mu M$). Des Weiteren wurden keine antibiotischen Effekte an Gram-negativen Bakterien wie *Escherichia coli* (MIGULA) CASTELLANI & CHALMERS sowie zwei weiteren Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa*, stellvertretend für die Auslöser nosokomialer Infektionen, beobachtet. Weiterführend wurden für Rubellin-sensitive Organismen minimale Hemmkonzentrationen (MIC) unter Lichteinfluss und -ausschluss ermittelt (Tabelle 3.16). Dabei war eine Lichtabhängigkeit der Wirkung deutlich zu erkennen. Während die Verbindungen Rubellin B, C und D unter Lichtausschluss das Wachstum von *B. subtilis*, *S. aureus* und teilweise von *M. vaccae* negativ beeinflussen und somit durchaus antibiotisch wirksam sind, verstärkt sich dieser Effekt um ein Vielfaches unter Lichteinfluss. Sehr deutlich war dieser Effekt bei dem Vancomycin-resistenten Darmbakterium *Enterococcus faecalis* ausgeprägt. War unter Lichtausschluss keine nennenswerte Wachstums hemmung zu erkennen, konnten mit Beleuchtung bei den Rubellin B und D bzw. Caeruleoramularin I hingegen sehr niedrige MIC-Werte ermittelt werden. Weiterhin waren bei der Verbindung Caeruleoramularin I nur nach Beleuchtung sehr schwache Effekte auf *B. subtilis* und *S. aureus* nachweisbar. Dieses Ergebnis lässt sich mit der schwächeren photodynamischen Aktivität dieser Verbindungen erklären (Kapitel 3.10.2). Die Substanz Rubellin E hingegen zeigte keine erwähnenswerten Effekte, lediglich eine schwache lichtabhängige Wachstums hemmung von *S. aureus* konnte beobachtet werden.

Tabelle 3.16: Antibiotische Effekte der Rubelline B, C, D, E, sowie von Caeruleoramularin I an ausgewählten Bakterien-Stämmen unter Lichteinfluss. Angegeben sind jeweils die minimalen Hemmkonzentrationen [MIC in μM] im Vergleich zum Referenzantibiotikum Ciprofloxacin (5 $\mu\text{g/ml}$).

	<i>Bacillus subtilis</i> 6633		<i>Staphylococcus aureus</i> SG 511 B3		<i>Mycobacterium vaccae</i> 10670		<i>Enterococcus faecalis</i> 1528 VRSA	
Verbindung [μM]	ohne Licht	mit Licht	ohne Licht	mit Licht	ohne Licht	mit Licht	ohne Licht	mit Licht
Rubellin B	31,25	<4	>1000	8	31,25	31,25	>1000	<4
Rubellin C	31,25	<4	62,5	8	250	250	>1000	62,5
Rubellin D	8	<4	15,6	8	62,5	62,5	500	<4
Rubellin E	>1000	>1000	>1000	125-250	>1000	>1000	>1000	>1000
Caeruleo- ramularin I	>1000	31,25	500	62,5-125	>1000	>1000	>1000	12,5
Ciprofloxacin	<0,05	<0,05	0,2	<0,05	0,8	<0,05	1,56	0,8

Die Resultate des antimikrobiellen Assays an zwei kommerziellen Bakterienstämmen von *S. aureus* nach Schastak et al. (2008) sind in Abbildung 3.38 dargestellt. Dieses Gram-positive Bakterium ist ein typischer Vertreter der Mikroflora von Verletzungswunden. Für Rubellin D zeigte sich eine deutliche, für Uredinorubellin I und II eine geringere und für Caeruleoramularin I eine sehr schwache Aktivität. Für das einfache Anthrachinon Chrysophanol konnte keine Wirkung festgestellt werden. *P. aeruginosa*, ein weiteres getestetes Wundbakterium, zeigte kaum Sensitivität gegenüber den Testsubstanzen (Daten nicht dargestellt). In Dunkelexperimenten konnten selbst für die höchste Testkonzentration keine Effekte nachgewiesen werden. In Abbildung 3.38 nicht dargestellt sind die Messwerte der einzelnen Verbindungen ohne Beleuchtung, da diese Werte mit der Kontrolle identisch waren, d. h. keine messbare Wirkung gezeigt werden konnte. Weiterhin ist in diesem Zusammenhang die photodynamische Inaktivierung mit Pferdeserum getestet worden. Aufgrund der Unwirksamkeit bzw. der Inaktivierung der photodynamischen Wirkung der Verbindungen sind auch diese Daten hier nicht dargestellt. Aufgrund der zu einer Inaktivierung der photodynamischen Aktivität führenden Wechselwirkung von Rubellinen mit Serum erscheint die Nutzbarkeit der Verbindungen für medizinisch-therapeutische Zwecke fraglich.

Zusammenfassend konnte jedoch auch in diesen Testsystemen die lichtabhängige Wirkung der Verbindungen bestätigt werden. Gegenüber Pilzen und Gram-negativen Bakterien konnte jedoch keine daraus resultierende schädigende Wirkung beobachtet werden. Dieser Fakt hängt wahrscheinlich mit der Zellwandstruktur der genannten Organismen zusammen.

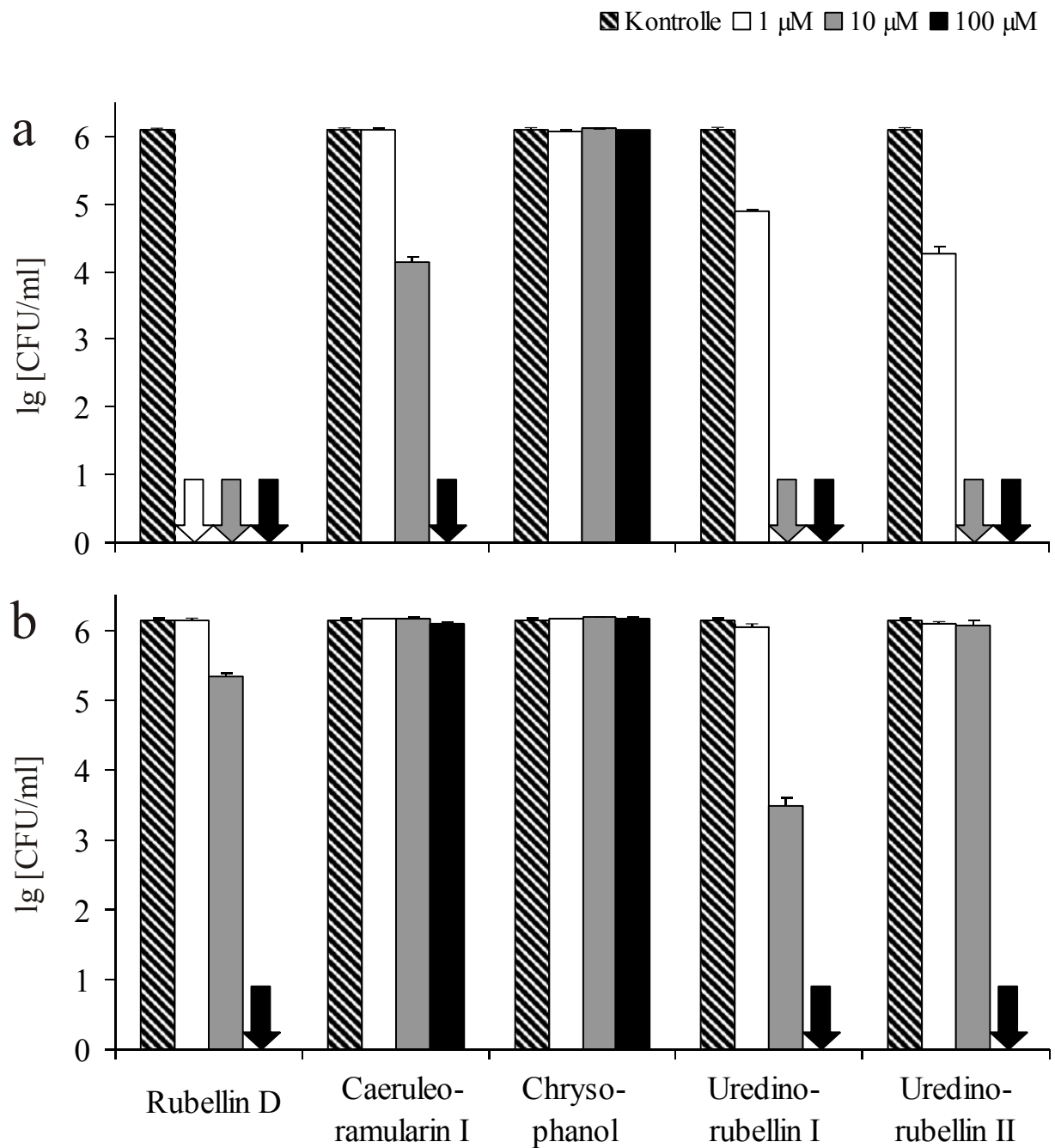


Abbildung 3.38: Antibiotische Effekte auf *S. aureus* DSM1104 (a) und *S. aureus* 11729 (b) durch die Testsubstanzen Rubellin D, Caeruleoramularin I, Chrysophanol und Uredinorubellin I und II nach Bestrahlung mit einer Kaltlichtlampe. Dargestellt sind die logarithmierten CFU pro ml. Die Kontrolle wurde ohne Testsubstanz und ohne Beleuchtung durchgeführt. Die Pfeile zeigen eine Sterberate der Bakterien von 100 % an.

3.10.4 Proliferations- und Zytotoxizitätsassays

Die Datenlage zur Wirkung von Anthrachinonen in humanen und Säugetier-Zelllinien ist sehr umfangreich. So wurden zahlreiche zytostatische bzw. antiproliferative (Lown 1993; Kuo et al., 1997; Cichewicz et al., 2004; Srinivas et al., 2007; Huang et al., 2007), aber auch apoptotische bzw. zytotoxische Effekte beschrieben (Pfeifer et al., 1992; Kagedal et al., 1999; Demirezer et al., 2001; Alderden et al., 2006). Hauptsächlich beschäftigten sich die Untersuchungen mit den einfachen Anthrachinonen wie z. B. Emodin, Aloe-Emodin und Rhein, bei denen es sich um 1,8-Hydroxyanthrachinone mit unterschiedlichem Substitutionsmuster an den Positionen C-3 und C-6 handelt. Aufgrund der Ähnlichkeit der isolierten Verbindungen zu den hochwirksamen und in der aktuellen Tumorthherapie eingesetzten Anthracyclinen, z. B. Doxorubicin wurden *In-Vitro*-Tests mit Krebszelllinien durchgeführt (Andersson et al., 1999; Beslija, 2003; Koceva-Chyla et al., 2005; Eklund et al., 2006).

Da die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Verbindungen zum einen durch das Anthrachinon-Grundgerüst im oberen Molekülteil charakterisiert sind, erscheinen analoge Wirkungen zu den oben beschriebenen Effekten möglich. Deshalb wurden Proliferations- und Zytotoxizitätsassays an Zelllinien verschiedener Herkunft durchgeführt. Um Effekte beobachten zu können, die nicht photodynamischen Ursprungs sind, wurden Proliferationsassays an den humanen Zelllinien Huvec und K-562 sowie ein Zytotoxizitätsassay an HeLa-Zellen unter Lichtreduktion durchgeführt. In einem zweiten Testansatz wurden estrogensensitive MCF-7-Zellen verwendet, um mögliche, für Hydroxyanthrachinone bereits beschriebene (Matsuda et al., 2001), estrogenartige Effekte nachweisen zu können. In einem dritten Ansatz wurden an weiteren Säugerzelllinien diverser Herkunft (HT29-, HIG-82-, J774A.1- und SK-Zellen) der Lichteinfluss bzw. die Auswirkung der photodynamischen Aktivität in einem Beleuchtungsexperiment untersucht.

Huvec-, K-562- und HeLa-Zelltests

An diesen drei Zelllinien wurden dosisabhängige zytotoxische respektive proliferationshemmende Wirkungen untersucht und jeweils die halbmaximale zytotoxische bzw. antiproliferative Konzentration (*cytotoxic concentration*, CC₅₀; *growth inhibition*, GI₅₀) bestimmt. Während die Zytotoxizität der Verbindungen an humanen Zervixkarzinomzellen (HeLa) untersucht wurde, kamen die humane erythromyelozytäre Leukämie-Zelllinie (K-562) und humane Endothelzellen der Umbilikalvene (Huvec) im Antiproliferationsassay zur Anwendung. Aufgrund ihrer gut reproduzierbaren Wachstumsraten unter standardisierten Kulturbedingungen (Dahse et al., 2001) sind diese drei genannten Zelllinien für die Untersuchungen besonders gut geeignet.

Die in Tabelle 3.17 zusammengefassten Ergebnisse belegen eindeutig die antiproliferativen Effekte der Rubelline mit Ausnahme von Rubellin E. Die Verbindung mit dem geöffneten Lactonring im unteren Teil des Moleküls zeigte in diesem Assay im getesteten Konzentrationsbereich weder proliferationshemmende noch zytotoxische Effekte (siehe auch MCF-7-Zelltest). Alle anderen Verbindungen zeigten im HeLa-Zelltest jedoch ebenfalls zytotoxische Aktivität. Die GI₅₀- und CC₅₀-Werte sind hierbei in allen drei Zelllinien annähernd gleich groß. Die Zelllinie K-562 scheint insgesamt etwas sensitiver zu sein als die Huvec-Zellen. Auffällig ist die starke Wirkung von Caeruleoramularin I (verändertes Anthrachinon-Gerüst) auf diese Zelllinie.

Die CC₅₀- bzw. GI₅₀-Werte der anderen getesteten Rubelline liegen - mit Ausnahme von Caeruleoramularin I in K-562-Zellen im unteren zweistelligen µM-Bereich. Da im Wesentlichen unter Lichtausschluss gearbeitet wurde, sind diese Effekte nicht auf eine photodynamische Aktivität zurückzuführen. Für eine Abgrenzung apoptotischer von primär zytotoxischen (zytotoxisch-nekrotischen) Effekten in HeLa-Zellen wären noch detailliertere Untersuchungen nötig.

Tabelle 3.17: Antiproliferative Effekte der Rubelline B, C, D, E, sowie von Caeruleoramularin I in Huvec-, K-562- und MCF-7-Zellen, sowie zytotoxische Effekte in den Zelllinien HeLa und SK. Als Vergleichsmykotoxine wurden an SK-Zellen Gliotoxin, Patulin und Deoxynivalenol mitgetestet.

Verbindung	Antiproliferative Effekte [μM]			Zytotoxizität [μM]	
	Huvec $\text{GI}_{50}^{\text{a}}$	K-562 $\text{GI}_{50}^{\text{a}}$	MCF-7 $\text{IC}_{50}^{\text{a}}$	HeLa $\text{CC}_{50}^{\text{a}}$	SK $\text{IC}_{50}^{\text{b}}$
Rubellin B	16	8,8	2,9	19	115,3
Rubellin C	22	15	6,6	22	237,6
Rubellin D	18	12	2,5	18	57,7
Rubellin E	>100	>100	46,5	>100	111,6
Caeruleoramularin I	22	2,7	9,6	17	475,3
Gliotoxin	-	-	-	-	1,2
Patulin	-	-	-	-	20,1
Deoxynivalenol	-	-	-	-	84,4

^a Versuchsdurchführung unter Lichtreduktion

^b Versuchsdurchführung unter Lichteinfluss ($1,2 - 1,6 \times 10^{-4} \text{ W/cm}^2$ über 44 h)

MCF-7-Zelltests

Die humane Estrogenrezeptor-positive Brustkrebszelllinie MCF-7 wird oft als *In-Vitro*-Modell für ein estrogensensitives Mammakarzinom verwendet (Brooks et al., 1973) und eignet sich somit zur Untersuchung potentiell estrogenartig wirkender Substanzen. Dabei korreliert eine estrogenartige mit einer proliferationssteigernden Aktivität. Matsuda et al. (2001) konnten für einen methanolischen Extrakt aus Wurzeln von *Polygonum cuspidatum* SIEBOLD & ZUCC. eine estrogenartige Wirkung in MCF-7 nachweisen, die in nachfolgenden Rezeptorbindungsstudien auf die Affinität verschiedener Hydroxyanthrachinone (Emodin u. a.) zu den Estrogenrezeptor-Subtypen α und β zurückzuführen war.

Um im hier durchgeführten Experiment solche oder antiproliferative respektive zytotoxische Effekte der Rubelline unabhängig von der photodynamischen Aktivität der Verbindungen beobachten zu können, wurde möglichst unter Lichtausschluss gearbeitet. Die Estrogensensitivität wurde mit 1 nM Estradiol (mittlere prozentuale Proliferation von $153,2 \pm 14,7 \%$) als Positivkontrolle pro Ansatz verifiziert.

Wie Tabelle 3.17 zu entnehmen ist, konnte eine estrogenartige Wirkung von Rubellinen nicht festgestellt werden. Die getesteten Verbindungen zeigten vielmehr eine deutliche antiproliferative Wirkung, wobei sich die Wirkintensitäten nur gering unterscheiden. Wie in den zuvor beschriebenen Assays an Huvec-, K-562- und HeLa-Zellen war Rubellin E am schwächsten wirksam. Rubellin B, C und D hingegen offenbarten etwas stärkere antiproliferative Aktivitäten (IC_{50} im einstelligen μM -Bereich).

Der Frage, ob den beobachteten Effekten eine akut zytotoxische Wirkung der Verbindungen zugrunde liegt, wurde mit einem LDH-Zytotoxizitätsassay nach einer Inkubationszeit von 24 h (Vergleich Proliferationsassay: 120 h) nachgegangen. Wie Abbildung 3.39 belegt, sind keine nennenswerten akut zytotoxischen Effekte im Bereich der GI_{50} -Werte nachweisbar. Erst bei einer Konzentration von 30 μ M für Rubellin C und D (beide Strukturen mit 5-gliedrigem Lactonring) bzw. 100 μ M für Caeruleoramularin I konnten zytotoxische Effekte beobachtet werden. Da jedoch die Signalwege von Zellzyklus und induziertem Zelltod eng miteinander verbunden sind, kann die Möglichkeit einer induzierten Apoptose durch die Verbindungen nicht ausgeschlossen werden.

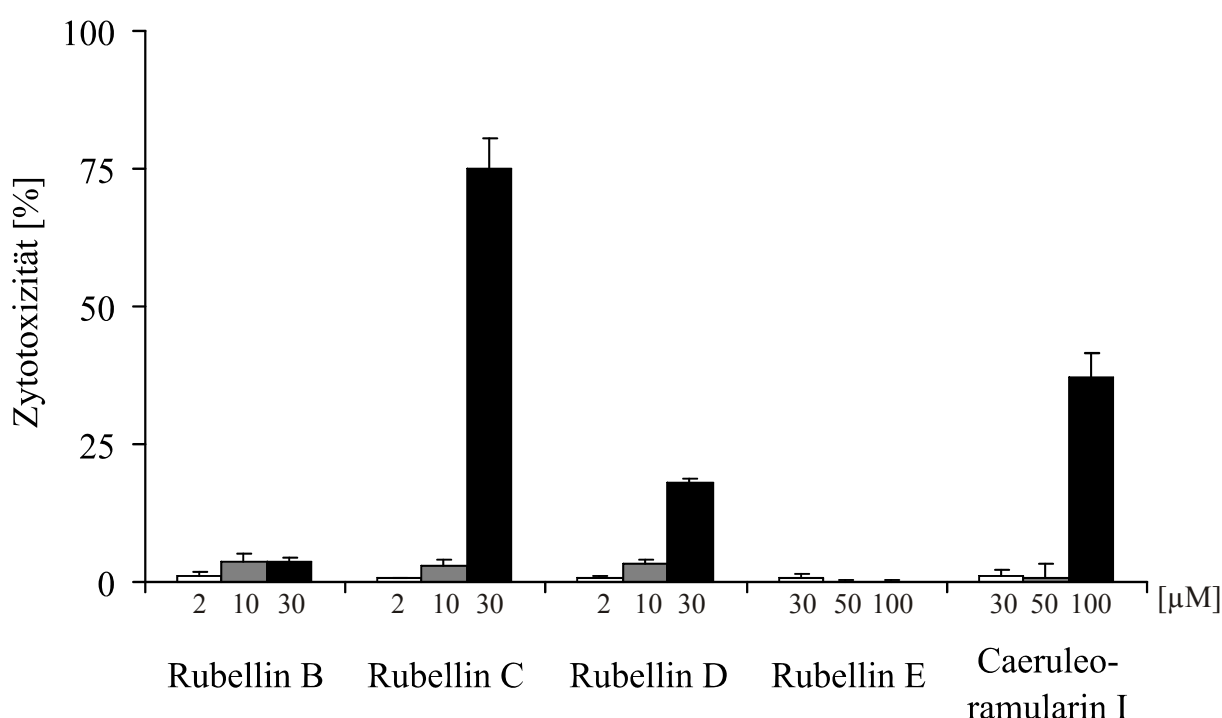


Abbildung 3.39: Prozentuale Zytotoxizität an der Brustkrebszelllinie MCF-7 nach 24-stündiger Inkubation (100 % entspricht 1 % Triton-X-100).

Zusammenfassend kann eindeutig eine estrogenartige Wirkung im Sinne einer Steigerung der Zellproliferation durch die Testsubstanzen ausgeschlossen werden. Hingegen konnten eindeutig dosisabhängige, antiproliferative Effekte, vergleichbar zu den beiden Zelllinien Huvec und K-562, belegt werden. Eine Ausnahme stellt wiederum Rubellin E dar, für das weder eine zytotoxische, noch eine antiproliferative Wirkung nachgewiesen werden konnte.

Photodynamische Effekte an HT29-, HIG-82-, J774A.1- und SK-Zellen

Bezugnehmend auf die beschriebene photodynamische Aktivität der Verbindungen (Kapitel 3.10.2) wurden an drei weiteren Zelllinien Beleuchtungsexperimente durchgeführt. Hierfür wurden Synviocyten aus Kaninchen (HIG-82), humane Kolonkarzinom-Zellen (HT29) und eine murine Makrophagen-Zelllinie (J774A.1) verwendet. Wie aus Abbildung 3.40 ersichtlich, zeigte Uredinorubellin I bemerkenswerte Effekte an allen drei Zelllinien, sogar an den humanen Darmkrebszellen, die gegenüber allen anderen Verbindungen nicht sensitiv sind. Während das einfache Anthrachinon Chrysophanol, sowie Caeruleoramularin I nur eine geringe Aktivität selbst bei der höchsten Testkonzentration von 10 μM aufwiesen, konnten für Rubellin D und Uredinorubellin II ähnlich starke Effekte wie für Uredinorubellin I an den nicht humanen Zelllinien beobachtet werden. Alle abgebildeten Testergebnisse resultieren aus einem Beleuchtungsversuch mit 2,5 W/cm^2 über einen Zeitraum von 40 s. Analog dazu erfolgte ein Experiment unter Lichtausschluss, wobei keine signifikante Abnahme der prozentualen Zellvitalität beobachtet werden konnte (Daten siehe Anhang, Tabelle A.14). Durch diese kurzzeitige Bestrahlung konnte somit auch an humanen und Säugetierzelllinien die photodynamische Aktivität der Anthrachinon-Derivate belegt werden.

Unterstützend kommen in diesem Zusammenhang die Ergebnisse des SK-Zellassays hinzu. Hier wurden Schweinenierenzellen (SK-Zellen) unter Lichteinfluss und Lichtausschluss mit den Verbindungen inkubiert. Nur unter Beleuchtung konnten Effekte beobachtet werden: die IC_{50} -Werte der getesteten Substanzen an SK-Zellen lagen im Bereich von 58 bis 475 μM (Tabelle 3.17). In Dunkelheit konnte bis zur höchsten Testkonzentration hingegen keine zytotoxische Aktivität beobachtet werden. Als Positivkontrollen wurden in diesem Assay bekannte Mykotoxine (Gliotoxin, Patulin und Deoxynivalenol) mitgeführt, wobei der Testparameter Licht bei diesen keine Auswirkung zeigte. Vergleicht man die IC_{50} -Werte, so zeigt jedoch nur Rubellin D unter Bestrahlung eine den Mykotoxinen Patulin und Deoxynivalenol annähernd äquivalente Wirkung (Gareis, 2006).

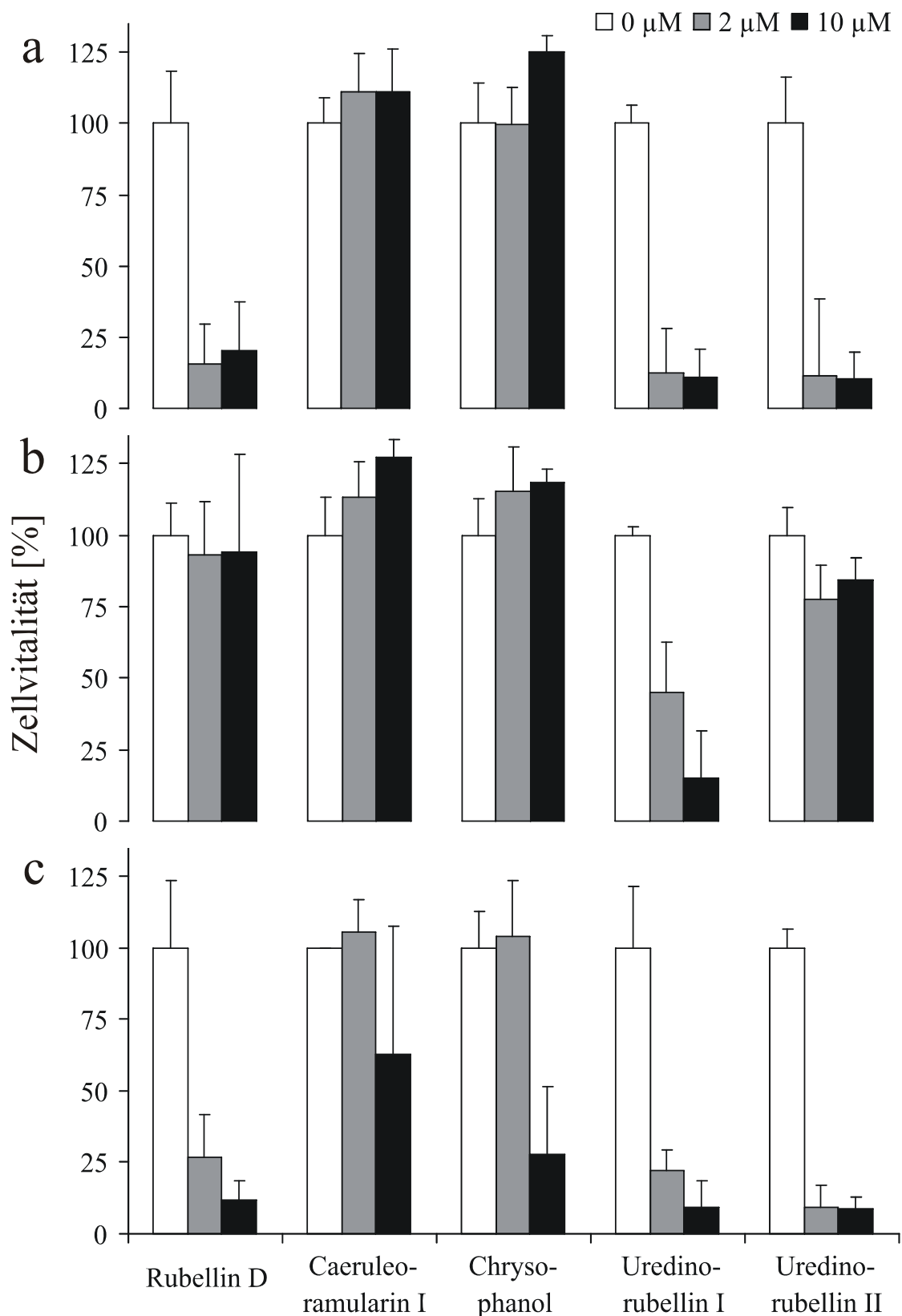


Abbildung 3.40: Prozentuale Zellvitalität nach 24-stündiger Inkubation und anschließender Beleuchtung der Zelllinien HIG-82 (a), HT29 (b) und J774A.1 (c) nach Behandlung mit Rubellin D, Caeruleoramularin I, Chrysophanol, sowie Uredinorubellin I und II (Es sind die Konzentrationen 0, 2 und 10 µM aufgetragen).

3.10.5 Tau-Aggregation

Auf der Suche nach wirksamen Grundstrukturen gegen die von neuronaler Degeneration gekennzeichnete Alzheimersche Erkrankung, der mit steigender Lebenserwartung in den Industrienationen eine stark anwachsende epidemiologische Bedeutung zu kommt, konnten Pickhardt et al. (2005) nachweisen, dass Anthrachinone als niedermolekulare Verbindungen die Aggregation von Tau-Proteinen verhindern bzw. die Auflösung bereits bestehender helikaler Filamente begünstigen können. Eine Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins hat eine Aggregatbildung im Zusammenhang mit dem Zytoskelett zur Folge, wodurch es letztendlich zum Absterben der betroffenen Zellen kommt. Die getesteten Verbindungen, u. a. Emodin und Daunorubicin wiesen im Testsystem inhibitorische Wirkungen im Konzentrationsbereich von 1 - 5 μM auf.

Im gleichen Assay wurden die Verbindungen Rubellin B, D und E untersucht. Es konnten analoge Messwerte für die Aggregationshemmung bzw. Depolymerisation von vorgefertigten Tau-Aggregaten, bestimmt werden. In einem LDH-Zytotoxizitätsassay an murinen Neuroblastomzellen (N2A) wurden jedoch in Konzentrationen von 15 μM zum Teil starke zellschädigende Effekte nachgewiesen (Tabelle 3.18). Obwohl diese Konzentration weit oberhalb der im Thioflavin-S-Assay ermittelten IC_{50} -/ DC_{50} -Werte liegt, dürften die Rubelline in der Alzheimer-Forschung kaum zur Anwendung kommen. Da jedoch für verschiedene Anthrachinon-Derivate Tau-hemmende Effekte gezeigt werden konnten, könnte diese Grundstruktur durchaus von Interesse sein.

Tabelle 3.18: Halbmaximale Hemmung der Aggregation (IC_{50}) bzw. Depolymerisation (DC_{50}) des Tau-Proteins [in μM] unter Einfluss von Rubellin B, D und E (Thioflavin-S-Assay), sowie die prozentuale Zytotoxizität (Testkonzentration: 15 μM) auf N2A-Zellen bei (LDH-Assay).

Verbindung	Zytotoxizität	Thioflavin-S-Assay	
	[%]	IC_{50} [μM]	DC_{50} [μM]
DMSO-Kontrolle	19,6	-	-
Daunorubicin	80,4	0,84	2,55
Rubellin B	88,6	1,57	3,25
Rubellin D	92,4	1,00	3,29
Rubellin E	86,4	0,81	1,00
5% Triton X-100	100,0	-	-

3.10.6 Antivirale Wirkung

Eine Reihe von Anthrachinonen weisen bekanntermaßen antivirale Aktivitäten auf (Schinazi et al., 1990; Andersen et al., 1991; Barnard et al., 1992). Chrysophanol, welches auch in den beiden *Ramularia*-Arten nachgewiesen werden konnte, wurde beispielsweise positiv auf antivirale Aktivität gegen Polio-Viren (Semple et al., 2001) getestet. Gegen Hepatitis-B-Viren weist diese Verbindung nur in glykosidierter Form eine starke, als Aglycon jedoch eine schwache Aktivität (Li et al., 2007) auf.

Die Wirksamkeit von Chrysophanol gegen Polio-Viren konnte in einem zpE-Hemmtest erfolgreich reproduziert werden. Die Referenzsubstanz erzielte im Vergleich zu anderen Arbeiten ähnliche IC_{50} Werte von 2,0 μM gegen Polio 2 und 2,8 μM gegen Polio 3-Viren. Es konnte jedoch keine antivirale Aktivität seitens der getesteten Verbindungen Rubellin B, C, D, E oder Caeruleoramularin I gegen die Virenstämme Polio 2 und Polio 3, wie auch gegen Coxsackie-Viren in HeLa-Zellen in nicht-zytotoxischen Konzentrationen bzw. der maximal tolerierten Dosis (CC_{10} , Tabelle 3.19) festgestellt werden.

Die im Rahmen des hier durchgeführten Zytotoxizitätstests ermittelten IC_{50} -Werte stimmen hingegen gut mit den Ergebnissen der anderen Untersuchungen (Kapitel 3.10.4, Tabelle 3.17) überein.

Tabelle 3.19: Zytotoxische Effekte der Rubelline B, C, D, E, sowie Caeruleoramularin I und Chrysophanol an virusresistenten Zelllinien (HeLa Ohio, MDCK und GMK). Dargestellt sind die jeweiligen CC_{50} - bzw. CC_{10} -Werte [μM].

Verbindung	Zytotoxizität [μM]		
	HeLa Ohio CC_{50} (CC_{10})	GMK CC_{50} (CC_{10})	MDCK CC_{50} (CC_{10})
Rubellin B	12,9 (7,0)	9,6 (5,2)	2,4 (0,4)
Rubellin C	15,0 (6,1)	9,3 (4,6)	6,1 (0,8)
Rubellin D	10,9 (6,1)	8,5 (3,9)	3,9 (2,0)
Rubellin E	>90 (>90)	>90 (73,9)	29,3 (3,2)
Caeruleoramularin I	20,1 (14,4)	44,3 (23,8)	19,4 (9,9)
Chrysophanol	>200 (85,8)	>200 (>200)	n.u.

n.u. - nicht untersucht

3.10.7 Aussagen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen

Betina (1989) beschreibt u. a. für das Anthrachinon Catenarin eine sehr gute antibakterielle Wirkung, welche allerdings durch geringe Veränderungen im Substitutionsmuster an den Positionen C-3, C-6 oder C-8 zum Teil bis zur Unwirksamkeit minimiert werden kann, obwohl der Anthrachinon-Grundkörper erhalten bleibt.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Strukturen weisen zum Teil große Unterschiede im Substituentenmuster auf, wobei die Auswirkungen bezüglich der Wirkintensität hier jedoch überwiegend als gering einzustufen sind. Zusammenfassend lassen sich über resultierende Struktur-Wirkungsbeziehungen (photodynamische Aktivität, antibiotische Wirkung, Proliferations- und Zytotoxizitätsassays) drei Kern-Aussagen ableiten:

- (1) Offensichtlich wird die photodynamische Aktivität durch den unteren Teil des Moleküls der Anthrachinon-Derivate beeinflusst, da Chrysophanol in den Testsystemen kaum Effekte zeigte.
- (2) Bezüglich der photodynamischen Aktivität beeinflussen Veränderungen im Anthrachinon-Grundkörper im oberen Teil des Moleküls negativ und verringern somit die Effektausprägung ebenfalls. So war in den zur photodynamischen Aktivität durchgeführten Tests (Kapitel 3.10.2) eine im Vergleich zu Rubellin B deutlich verringerte Fettsäureperoxidation durch Caeruleoramularin I zu beobachten. Unterschiede im detaillierten Aufbau des unteren Teils wie z. B. die Existenz oder Art des Lactonrings scheinen hingegen eine untergeordnete Rolle zu spielen.
- (3) Für die antibiotischen, antiproliferativen und zytotoxischen Effekte ist das Vorhandensein eines Lactonrings im unteren Molekülteil jedoch offenbar von entscheidender Bedeutung. So war Rubellin E als einzige Verbindung ohne Lactonring in allen Testsystemen mit Abstand am schwächsten wirksam.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Nach dem vermehrten Auftreten einer bis in die 1980er Jahre unbeachteten Sprengelkrankheit an Gerste wurde das Pathogen *Ramularia collo-cygni* (CAV.) SUTTON & WALLER als Verursacher erkannt und durch Huss et al. (1987) beschrieben. Aufgrund der Ertragseinbußen von über 16 % besteht ein großer Forschungsbedarf hinsichtlich der involvierten Phytotoxine.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit waren Isolierung, Strukturaufklärung und Erfassung der Biosynthese der biologisch aktiven Metabolite dieses phytopathogenen Pilzes und verwandter Taxa. Ferner sollten durch molekularbiologische Untersuchungen Einblicke in die Phylogenie des Pilzes und gegebenenfalls in den biosynthetischen Zusammenhang erlangt werden. Schließlich wurde die biologische Aktivität der Verbindungen sowohl im Zusammenhang mit der *Ramularia leaf spot disease* (RLSD) als auch hinsichtlich einer möglichen medizinisch-therapeutischen Relevanz untersucht.

Mit Hilfe klassischer chromatographischer Methoden konnte eine Reihe rot und gelb gefärbter Haupt- und Nebenverbindungen isoliert und mit den üblichen spektroskopischen Methoden (UV/Vis-, IR- und Massenspektroskopie, Polarimetrie) charakterisiert werden. Die endgültige Strukturaufklärung erfolgte vor allem mit homo- und heteronuklearen 2D-NMR-Verfahren. Diese sekundären Naturstoffe konnten der Stoffklasse der Anthrachinone zugeordnet werden. Vier dieser Verbindungen (Rubellin A - D) wurden bereits durch Arnone et al. (1986, 1989) aus *Mycosphaerella rubella* NIESSL, einem Pathogen der Arzneipflanze *Angelica sylvestris* L., beschrieben. In Anlehnung an diese Arbeiten wurden drei der neu isolierten Verbindungen mit Rubellin E, F¹ bzw. 14-Dehydrorubellin D bezeichnet. Zwei weitere bisher nicht beschriebene Substanzen mit veränderter anthranoider Grundstruktur, die zu einer Blaufärbung des Moleküls führt, wurden als Caeruleoramularin I und II¹ bezeichnet.

Mit dem Stamm 43/3 von *R. collo-cygni* wurde eine Wachstums- und Bildungskinetik hinsichtlich der Rubelline A - D durchgeführt. Als Hauptverbindungen waren Rubellin B und D sowohl im Mycel als auch im Kulturfiltrat zu finden. Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung der Rubelline wachstumsassoziiert erfolgt. Offensichtlich werden zunächst die 7-gliedrigen Lactone (Rubellin A und B) biosynthetisiert, die dann auf nicht-enzymatischem Wege vor allem im Kulturfiltrat zu den stabileren 5-gliedrigen Lactonen (Rubellin C und D) umgewandelt werden.

Für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Fähigkeit zur Toxinproduktion wurden in einem *Screening* fünf *Ramularia*-Arten und 16 Stämme von *R. collo-cygni* aus unterschiedlichen Regionen untersucht. Es konnte die Bildung der Rubelline in allen Stämmen von *R. collo-cygni*, sowie einer weiteren *Ramularia*-Art nachgewiesen werden.

¹ Strukturvorschlag

Durch den erfolgreichen *In-Vivo*-Nachweis der Rubelline A - D aus infiziertem Blattmaterial konnte die Bedeutung dieser Verbindungen für die Ausprägung der Symptomatik und damit für die Pathogenese der RLSD untermauert werden. In Saug- und Inokulationsversuchen an Wirtspflanzen konnte eine lichtabhängige Nekrosenbildung beobachtet werden. Mit verschiedenen *In-Vitro*-Experimenten wurde gezeigt, dass dem Wirkmechanismus der Rubelline eine photodynamische Aktivität zugrunde liegt. Es werden offenbar verschiedenartige radikale Sauerstoffspezies (ROS) generiert, hauptsächlich vor allem Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$). Veränderungen im Anthrachinon-Grundkörper beeinflussen die photodynamische Aktivität negativ, so dass Caeruleoramularin I nur geringe Mengen ROS bildet. Die Ergebnisse der Untersuchung von Rubellin E (Struktur mit geöffnetem Lactonring) mit einer differenzierten ROS-Bildung verdeutlicht, dass der untere Molekülteil hierfür ebenfalls eine Rolle spielt.

Bei der Untersuchung weiterer *Ramularia*-Arten fiel der hyperparasitäre Pilz *Ramularia uredinicola* KHODAP. & U. BRAUN durch ein sehr ähnliches Toxinspektrum auf, obwohl dieser Organismus anderen ökologischen Bedingungen unterliegt. Es konnten in diesem Zusammenhang zwei bekannte Anthrachinone (Chrysophanol, Helminthosporin) und zwei neue Strukturen beschrieben werden, die aufgrund ihrer Herkunft als Uredinorubellin I und II bezeichnet wurden. Sowohl Chrysophanol und Helminthosporin als auch Uredinorubellin I und II konnten analytisch auch in Extrakten von *R. collo-cygni* als Minorkomponenten nachgewiesen werden.

Als Teil der molekular genetischen Untersuchungen wurde die ribosomale ITS-Genregion aller Stämme und Arten durch PCR amplifiziert, anschließend kloniert und sequenziert. Es konnte die phylogenetische Stellung der untersuchten *Ramularia*-Arten neben der morphologischen Zuordnung bestätigt werden. Die phylogenetische Analyse der Sequenzen zeigte eine deutliche Zuordnung der *Ramularia*-Arten in ein gut unterstütztes *cluster* (inkl. einiger *Mycosphaerella*-Arten). Ein chemotaxonomisches Muster hinsichtlich der Rubellin-Bildung konnte einzelnen monophyletischen Gruppen von *Ramularia*-Arten jedoch nicht zugewiesen werden.

Eine Zielstellung in dieser Arbeit war die Aufklärung des Biosyntheseweges der Verbindungen. Fütterungsversuche mit ^{13}C -markierten Substraten ([1- ^{13}C]- und [2- ^{13}C]-markiertes Acetat) als Präkursoren zeigten zweifelsfrei, dass die Biosynthese der Rubelline über den Polyketid-Weg erfolgt. Die untersuchten Hauptverbindungen Rubellin B und D wurden vollständig aus Acetat-Einheiten aufgebaut. Weiterführende Untersuchungen mit uniform markierter Glucose bezüglich des Faltungsmusters der Polyketidkette offenbarten den für Pilze üblichen *Folding-F-Mode*. Die Minorkomponenten Chrysophanol und

Helminthosporin sowie Uredinorubellin I und II fügen sich nahtlos in das Biosyntheseschema ein.

Mit degenerierten Primern (Amnuaykanjanasin et al., 2005) konnten konservierte Motive der Ketoacylsynthase amplifiziert werden. Die Zuordnung dieser Gene zur Gruppe der reduzierenden Polyketid-Synthasen (PKS) vorwiegend zum *subclade* II, konnte gezeigt werden. Dies bestätigt ebenfalls den Polyketid-Biosyntheseweg der Rubelline. Die Beschreibung von Multienzymkomplexen auf molekulargenetischer Ebene stellt ein umfassendes Themengebiet dar, das in dieser Arbeit nicht in vollem Umfang erfasst werden konnte. Die Ergebnisse liefern jedoch erste Hinweise zur Lokalisierung dieser Gene.

Auf der Suche nach potentiellen medizinischen Anwendungen der isolierten *Ramularia*-Metabolite wurden diese in umfassenden biologischen Untersuchungen hinsichtlich ihres Wirkpotentials getestet. So wurden die antibiotische Aktivität gegen ausgewählte Mikroorganismen, ihr Einfluss auf die Aggregation des Tau-Proteins sowie mögliche antivirale Effekte untersucht. In Proliferations- und Zytotoxizitätstests wurde die Wirkung auf verschiedene humane und Säugerzelllinien erfasst.

Mit Ausnahme von Rubellin E zeigten die getesteten Verbindungen antiproliferative respektive zytotoxische Effekte im mittleren μM -Bereich. Estrogenartige und antivirale (Ausnahme Chrysophanol) Effekte konnten nicht beobachtet werden. Es konnten eine Beeinflussung der Aggregation des Tau-Proteins, das bei der Pathogenese von Morbus Alzheimer eine wichtige Rolle spielt, beobachtet werden, wobei ebenfalls zytotoxische Wirkungen in höheren Konzentrationen zu verzeichnen waren. Antibiotische Effekte konnten vor allem gegen Gram-positive Bakterien beobachtet werden, wobei sich für Rubellin B und D die stärkste Hemmwirkung offenbarte. Es konnte weiterhin eine Verstärkung der antibiotischen sowie der zytotoxischen Wirkung unter Lichteinfluß beobachtet werden.

Aufbauend auf den vorliegenden Ergebnissen könnten folgende zukünftige Forschungsprojekte von Interesse sein:

- Suche nach dimeren Anthrachinonen als Intermediate zwischen den monomeren Strukturen Chrysophanol/Helminthosporin auf der einen und Uredinorubellin I bzw. II auf der anderen Seite, vergleichbar mit entsprechenden pflanzlichen Metaboliten (Itokawa et al., 1993; Alemayehu et al., 1998).
- Weitere Untersuchungen der PKS-Gene (z. B. auf Expressionsebene) sowie anderer Enzyme, wie einer beteiligten Monooxygenase bei einer eventuellen Baeyer-Villiger Oxidation. Hierzu wurden bereits Untersuchungen an verschiedenen Bakterien-Arten wie

z. B. *Comamonas*, *Pseudomonas* oder *Xanthobacter* (Fraaije et al., 2002; Van Beilen et al., 2003) durchgeführt.

- Da von anderen Anthrachinon-Derivaten eindeutige Effekte gegen Malaria (Onegi et al., 2002; Wube et al., 2005) bzw. *Helicobacter pylori* (Wang & Chung, 1997) sowie interkalare Eigenschaften (Baguley, 1991) bekannt sind, sollten dazu auch Untersuchungen mit den in dieser Arbeit beschriebenen Verbindungen durchgeführt werden.
- Ausgehend von der photodynamischen Wirkung der *Ramularia*-Metabolite wären Anwendungen in der Phototherapie, z. B. bei malignen Tumoren oder auch bei Psoriasis denkbar, die von anderen Anthrachinon-Derivaten bereits bekannt sind (Hartley et al., 1990; Garbo, 1996; Koceva-Chyla et al., 2006).
- Wie in der Naturstoff-Forschung allgemein üblich, könnten chemische Modifikationen der Rubelline neue Erkenntnisse zur Struktur-Wirkungsbeziehung liefern und daraus eventuell neue Leitstrukturen für therapeutische Anwendungen entwickelt werden.

5 Summary

At the end of the 1980s a novel leaf spot disease appeared on barley in Central Europe. The fungal pathogen *Ramularia collo-cygni* (Cav.) SUTTON & WALLER was identified by Huss et al. (1987) as major agent causing this disease. Due to massive crop yield losses (up to 16 %) it is very important to understand effects of the toxins produced by the pathogen in order to improve controlling strategies.

The main purpose of the here presented thesis was the isolation, structure elucidation and clarification of the biosynthesis of the biologically active metabolites produced by this phytopathogenic fungus and closely related fungi. Moreover molecular biological approaches were used to provide insights into the phylogeny of the investigated pathogenic fungi and to give further evidence for the biosynthetic pathway. Beside the involvement in *Ramularia* leaf spot disease (RLSD), a particular interest was also to investigate other biological activities of the metabolites (e.g. in medical research).

In the first major attempt, several red and yellow coloured compounds were isolated from liquid cultures of *R. collo-cygni*, purified with classical chromatographic methods and characterised using spectroscopic methods (UV/Vis, IR, MS and polarimetry). The final structures of these compounds were elucidated using homo- and heteronuclear 2D-NMR. The compounds were assigned to the chemical class of the anthraquinones. Four of these substances (rubellin A - D) were already known from *Mycosphaerella rubella* NIESSL (Arnone et al., 1986; 1989), a pathogen of the medicinal plant *Angelica sylvestris* L. Three compounds were isolated and identified in this study for the first time, and were named rubellin E, F² and 14-dehydro rubellin D, respectively. Two further substances with a different quinonoid fundamental structure, leading to a blue colour of the molecule, were not described so far in literature and here named caeruleoramularin I and II².

In a following study, *R. collo-cygni* strain 43/3 was cultivated for 21 days and the formation of rubellins A - D were observed in a growth and production kinetic. Rubellin B and D were predominantly produced, isolated from culture filtrate as well as from mycelium. In a general trend, the 7-membered lactones (rubellin A and B) were produced first and then non-enzymatic processed to the more stable 5-membered lactones (rubellin C and D).

In further investigations, five *Ramularia* species and 16 regionally different strains of *R. collo-cygni* were screened for their ability of toxin formation, i.e. rubellin production.

The rubellins A - D were successfully identified *in vivo* in infected barley leaves, thus proofing the importance of these compounds in the pathology of RLSD. In suction and inoculation treatments on hosts, a light-dependent necrosis formation was observed. With different *in vitro*

² proposed structure

experiments it was shown that the rubellins are photodynamically active, the probable working principle of RLSD. Obviously different radical oxygen species (ROS) are generated, mainly singlet oxygen ($^1\text{O}_2$). Changes in the fundamental structure of anthraquinone seem to negatively affect the photodynamic activity, as for example caeruleoramularin I produced only small quantities of ROS. In addition, rubellin E (structure with opened lactone ring) also differentiates regarding the ROS production, probably due to changes in the lower part of the molecule.

Previous findings are based on only one strain of *R. collo-cygni*, and lead to the question if locally different strains as well as different *Ramularia* species show the same toxin spectrum. A screening procedure revealed a very similar toxin spectrum in the hyperparasitic fungus *Ramularia uredinicola* KHODAP. & U. BRAUN, which features a different ecological strategy than *R. collo-cygni*. Two already known monomer anthraquinones (chrysophanol and helminthosporin) and two new structures could be described for *R. uredinicola*, which were named according to their origin uredinorubellin I and II. In a reverse test, all four compounds were also found in small quantities in the crude extract of *R. collo-cygni*.

As part of the molecular biological approach, the ribosomal ITS (internal transcribed spacer) region of all investigated *Ramularia* species and strains were amplified using PCR, and then cloned and sequenced, thus providing information about the phylogenetic position of the taxa additional to their morphological identification. The phylogenetic analysis of the sequences showed a good supported clade of all *Ramularia* species (anamorph) including few *Mycosphaerella* species (teleomorph), within the larger systematic group of the *Mycosphaerellaceae*. This is consistent with other reports in the actual literature. However, a chemo-taxonomical pattern, i.e. that all rubellin producing species form one monophyletic group, was not found.

One aim of the presented thesis was to identify the biosynthetic pathway leading to the formation of the different rubellin compounds. Liquid cultures of *R. collo-cygni* were fed with ^{13}C -labelled acetate, which were completely processed into rubellin B and D, thus unequivocally proofing the polyketide pathway. Moreover, feeding of ^{13}C -labelled glucose revealed the folding-F-mode of the investigated polyketides, which is typical for fungi. The minor compounds chrysophanol, helminthosporin (monomers) as well as uredinorubellin I and II also fit in the proposed biosynthetic pathway.

In recent research, polyketide synthase (PKS) genes were identified and investigated for their involvement in the production of bioactive molecules (polyketides) *via* the polyketide pathway. As the here investigated rubellins and related compounds belong to the polyketides, it was

appropriate to conduct a molecular biological study to identify possible PKS genes in *R. collo-cygni* and *R. uredinicola*. Degenerated primers were used in PCR to amplify fragments of the ketoacylsynthase, a part of the PKS gene. Altogether five different PKS genes in *R. collo-cygni* and two in *R. uredinicola* (all reducing PKS genes, subclade II) were found, providing further evidence for the polyketide pathway. However, this molecular-genetic approach reveals a complex system, which could not be fully covered in this work and further investigation, i.e. expression analysis has to be done to understand the involvement of each single PKS gene in the biosynthesis of the rubellins.

In search of new medical applications of natural substances, the here identified fungal compounds were tested for their bioactivity. In a first attempt, *Ramularia* metabolites were examined for their antibiotic activity against selected microorganisms, their influence in the aggregation of the protein tau as well as for possible antiviral effects. In proliferation and cytotoxicity assays, the effects on different human and mammalian cell lines were identified.

Antiproliferative effects were determined in middle μM ranges of the different metabolites, except for Rubellin E, which was only weakly effective. Neither antiviral (exception chrysophanol) nor estrogenetic effects were observed. An assay for the aggregation of the protein tau, important in pathogenesis of Alzheimer's disease, showed partially good results. However, a strongly increased toxicity was recorded, which interferes at this stage with potential medical applications. Antibiotic effects were mainly observed with gram-positive bacteria, whereby rubellin B and D showed very good effectiveness. In general, the effectiveness of the rubellins was to be classified as light-dependent in all experiments.

The here presented study largely resolves the structures and the biosynthetic pathway of the produced toxins of *R. collo-cygni* and *R. uredinicola*. It also presented first molecular-genetic insights and first assays for their bioactivity. However, some questions remain and the gained results of this thesis provide a basis for future investigations, such as:

Search for dimeric anthraquinones, as intermediates in the proposed biosynthetic pathway. Moreover, the detailed analysis of the PKS gene expression and their involvement in the production of the different toxins as well as the identification of other genes involved (a candidate might be the monooxygenase, responsible for the possibly Baeyer-Villiger oxidation). Based on the photodynamic activity of the *Ramularia* metabolites, a application in the phototherapy might be possible (e.g. with malignant tumours). Further investigations of other biological activities should be considered as well. As a common procedure in the applied natural substance research, chemical modifications of the rubellins might provide new structure-response relationships and thus could lead to new pharmaceutical applications.

6 Literatur

- Abe Y., T. Suzuki, C. Ono, K. Iwamoto, M. Hosobuchi, H. Yoshikawa** (2002): Molecular cloning and characterization of an ML-236B (compactin) biosynthetic gene cluster in *Penicillium citrinum*. *Molecular Genetics and Genomics* 267 (5): 636-646.
- Aguirre J., M. Rios-Momberg, D. Hewitt, W. Hansberg** (2005): Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology* 13 (3): 111-118.
- Alderden R.A., H.R. Mellor, S. Modok, T.W. Hambley, R. Callaghan** (2006): Cytotoxic efficacy of an anthraquinone linked platinum anticancer drug. *Biochemical Pharmacology* 71 (8): 1136-1145.
- Alemayehu G., B. Abegaz, W. Kraus** (1998): A 1,4-anthraquinone-dihydroanthracenone dimer from *Senna sophora*. *Phytochemistry* 48 (4): 699-702.
- Altschul S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman** (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Amelung D.** (1999): *Ramularia*-Blattfleckenkrankheit - Eine neue Gerstenkrankheit in Deutschland. *Getreide* 5 (1): 47.
- Aminian-Saghafi T., G. Nasini, T. Caronna, A.M. Braun, E. Oliveros** (1992): Quantum yields of singlet-oxygen production by some natural quinoid fungal metabolites and derivatives. *Helvetica Chimica Acta* 75 (2): 531-538.
- Amnuaykanjanasin A., J. Punya, P. Paungmoung, A. Rungrud, A. Tachaleat, S. Pongpattanakitsote, S. Cheevadhanarak, M. Tanticharoen** (2005): Diversity of type I polyketide synthase genes in the wood-decay fungus *Xylaria* sp. BCC 1067. *FEMS Microbiology Letters* 251 (1): 125-136.
- Andersen D.O., N.D. Weber, S.G. Wood, B.G. Hughes, B.K. Murray, J.A. North** (1991): *In vitro* virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives. *Antiviral Research* 16: 185-196.
- Andersson B.S., S. Eksborg, R.F. Vidal, M. Sundberg, M. Carlberg** (1999): Anthraquinone-induced cell injury: acute toxicity of carminomycin, epirubicin, idarubicin and mitoxantrone in isolated cardiomyocytes. *Toxicology* 135 (1): 11-20.
- Andrade L.H., A.F. Keppler, I.H. Schoenlein-Crusius, A.L.M. Porto, J.V. Comassetto** (2004): Evaluation of acetophenone monooxygenase and alcohol dehydrogenase activities in different fungal strains by biotransformation of acetophenone derivatives. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 31: 129-135.

- Arnone A., L. Camara, G. Nasini, G. Assante** (1986): Secondary mould metabolites. Part 15. Structure elucidation of rubellins A and B, two novel anthraquinone metabolites from *Mycosphaerella rubella*. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* (2): 255-260.
- Arnone A., G. Assante, T. Caronna, V. di Modugno, G. Nasini** (1988): Comparative evaluation of photodynamic efficiency of some natural quinonoid fungal toxins. *Phytochemistry* 27: 1669-1674.
- Arnone A., G. Nasini, L. Camara, G. Assante** (1989): Secondary mould metabolites. XXV. Structure of rubellins C and D, two novel anthraquinone metabolites from *Mycosphaerella rubella*. *Gazzetta Chimica Italiana* 119: 35-39.
- Arrieta-Baez D., R. Roman, R. Vazquez-Duhalt, M. Jiménez-Estrada** (2002): Peroxidase-mediated transformation of hydroxy-9,10-anthraquinones. *Phytochemistry* 60: 567-572.
- Assante G., R. Locci, L. Camarda, L. Merlini, G. Nasini** (1977): Screening of the genus *Cercospora* for secondary metabolites. *Phytochemistry* 16: 243-246.
- Atlas R.M. & L.C. Parks** [Eds.] (1993): Handbook of microbiological media. Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, *CRC Press*, 973.
- Austin M.B. & J.P. Noel** (2003): The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural Product Reports* 20: 79-110.
- Babu K.S., P.V. Srinivas, B. Praveen, K.H. Kishore, U.S. Murty, J.M. Rao** (2003): Antimicrobial constituents from the rhizomes of *Rheum emodi*. *Phytochemistry* 62: 203-207.
- Baguley B.C.** (1991): DNA intercalating anti-tumour agents. *Anticancer Drug Research* 6 (1): 1-35.
- Ballio A.** (1991): Non-host-selective fungal phytotoxins - biochemical aspects of their mode of action. *Experientia* 47: 783-790.
- Barnard D.L., J.H. Huffman, J.L. Morris, S.G. Wood, B.G. Hughes, R.W. Sidwell** (1992): Evaluation of the antiviral activity of anthraquinones, anthrones and anthraquinone derivatives against human cytomegalovirus. *Antiviral Research* 17: 63-77.
- Beck J., S. Ripka, A. Siegner, E. Schlitz, E. Schweitzer** (1990): The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*: Its gene structure relative to that of other polyketide synthases. *FEBS Journal* 192: 487-498.
- Becker H.G.O., W. Berger, G. Domschke, E. Fanghänel, J. Faust, M. Fischer, F. Gentz, K. Gewalt, R. Gluch, R. Meyer, K. Müller, D. Pavel, H. Schmidt, K. Schollberg, K. Schwetlick, E. Seiler** (1993): Organikum: organisch-chemisches Grundpraktikum. 19. Auflage. *Deutscher Verlag der Wissenschaften*, Leipzig, Berlin, Heidelberg, 58.

- Beslija S.** (2003): The role of anthracyclines/anthraquinones in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 81: S25-S32.
- Betina V.** (1989): Structure-activity relationship among mycotoxins. *Chemico-Biological Interactions* 71: 105-146.
- Böhnert H.U., I. Fudal, W. Dioh, D. Tharreau, J.L. Notteghem, M.H. Lebrun** (2004): A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistant rice. *Plant Cell* 16 (9): 2499-2513.
- Braun U.** (1991): Studies on *Ramularia* and allied genera (IV). *Nova Hedwigia* 53 (3-4): 291-305.
- Braun U.** (1998): A monograph of *Cercospora*, *Ramularia* and allied genera (phytopathogenic hyphomycetes). Volume 2, Eching, *IHW-Verlag*, 202-203.
- Braun U.** (2004): *Ramularia collo-cygni* (*Ramularia* Leaf Blight of Barley) - Taxonomy and Phylogeny. *Proceedings of 2nd International Workshop on Barley Leaf Blights*. Aleppo, Syrien, 7.-11. April 2002, 370-375.
- Bredereck K., H. Kimmich, G. Sigmund** (1977): Anthraquinones VIII. Note on oxidation of (hydroxymethyl) anthraquinones. *Liebigs Annalen der Chemie* 1977 (1): 184-188.
- Briggs D. E.** (1966): Gibberellin-like Activity of Helminthosporol and Helminthosporic Acid. *Nature* 210: 418-419.
- Bringmann G., T.F. Noll, T.A.M. Gulder, M. Grune, M. Dreyer, C. Wilde, F. Pankewitz, M. Hilker, G.D. Payne, A.L. Jones, M. Goddellow, H.P. Fiedler** (2006): Different polyketide folding modes converge to an identical molecular architecture. *Nature Chemical Biology* 2 (8): 429-433.
- Bringmann G., T.F. Noll, T. Gulder, M. Dreyer, M. Grüne, D. Moskau** (2007): Polyketide folding in higher plants: Biosynthesis of the phenylanthraquinone knipholone. *Journal of Organic Chemistry* 72: 3247-3252.
- Brooks S.C., E.R. Locke, H.D. Soule** (1973): Estrogene receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *Journal of Biological Chemistry* 248: 6251-6253.
- Bruggisser R., K. von Daeniken, G. Jundt, W. Schaffner, H. Tullberg-Reinert** (2002): Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Medica* 68: 445-448.
- Buscot F., J.C. Munch, J.Y. Charcosset, M. Gardes, U. Nehls, R. Hampp** (2000): Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 24 (5): 601-614.

- Cavara F.** (1893): Über einige parasitische Pilze auf Getreide. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten* 3: 16-26.
- Chrysai-Tokousbalides M. & M.A. Kastanias** (2003): Cynodontin: a fungal metabolite with antifungal properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4920-4923.
- Cichewicz R.H., Y.J. Zhang, N.P. Seeram, M.G. Nair** (2004): Inhibition of human tumor cell proliferation by novel anthraquinones from daylilies. *Life Sciences* 74 (14): 1791-1799.
- Crous P.W., A. Aptroot, J.-C. Kang, U. Braun, M.J. Wingfield** (2000): The genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. *Studies in Mycology* 45: 107-121.
- Crous P.W., J.-C. Kang, U. Braun** (2001): A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequence and morphology. *Mycologia* 93 (6): 1081-1101.
- Dagne E. & W. Steglich** (1984): Knipholone: a unique anthraquinone derivative from *Kniphophia foliosa*. *Phytochemistry* 23 (8): 1729-1731.
- Dahse H.-M., B. Schlegel, U. Gräfe** (2001): Differentiation between inducers of apoptosis and nonspecific cytotoxic drugs by means of cell analyzer and immunoassay. *Pharmazie* 56: 489-491.
- Danielsen K., D.W. Aksnes, G.W. Francis** (1992): NMR-Study of some anthraquinones from rhubarb. *Magnetic Resonance in Chemistry* 30 (4): 359-360.
- Daub M.E. & R.P. Hangarter** (1983): Light-induced production of singlet oxygen and superoxide by the fungal toxin, cercosporin. *Plant Physiology* 73: 855-857.
- Demirezer L.O., A. Kuruuzum-Uz, I. Bergere, H.J. Schiewe, A. Zeeck** (2001): The structures of antioxidant and cytotoxic agents from natural source: anthraquinones and tannins from roots of *Rumex patientia*. *Phytochemistry* 58 (8): 1213-1217.
- Denizot F. & R. Lang** (1986): Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunology Methods* 89: 271-277.
- Desjardins A.E. & T.M. Hohn** (1997): Mycotoxins in plant pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10: 147-152.
- Dickscheit R. & E. Janke** (1967): Handbuch der mikrobiologischen Laboratoriumstechnik. Dresden, Theodor Steinkopff Verlag, 268.
- Eckert R.L. & B.S. Katzenellenbogen** (1982): Effects of estrogens and antiestrogens on estrogen receptor dynamics and the induction of progesterone receptor in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Research* 42: 139-144.

- Eklund J., M. Kozloff, J. Vlamakis, A. Starr, M. Mariott, L. Gallot, B. Jovanovic, L. Schilder, E. Robin, M. Pins, R.C. Bergan** (2006): Phase II study of mitoxantrone and ketoconazole for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer* 106 (11): 2459-2465.
- Ellis M.B. & J.P. Ellis** (1997): Microfungi on Land Plants: An Identification Handbook. *The Richmond Publishing Co. Ltd*, Slough, United Kingdom, Second Edition.
- Elstner E.F. & D. Frommeyer** (1978): Analysis of different mechanisms of photosynthetic oxygen reduction. *Zeitschrift für Naturforschung* 33c: 276-279.
- Elstner E.F.** (1982): Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annual Review of Plant Physiology* 33: 73-96.
- Fain V.Y., B.E. Zaitsev, M.A. Ryabov** (2003): A quantum-chemical study of prototropic tautomerism in 1-hydroxy-9,10-anthraquinones. *Russian Journal of General Chemistry* 73 (4): 657-663.
- Fain V.Y., B.E. Zaitsev, M.A. Ryabov** (2005): Tautomerism of the natural 1,8-dihydroxy-9,10-anthraquinones chrysophanol, aloë-emodin, and rhein. *Chemistry of Natural Compounds* 41 (2): 146-152.
- Fain V.Y., B.E. Zaitsev, M.A. Ryabov** (2006): Tautomerism of anthraquinones: IV.* 1-hydroxy-9,10-anthraquinone and its substituted derivatives. *Russian Journal of Organic Chemistry* 42 (10): 1469-1472.
- FAO** (2008): Major food and agricultural commodities and producers. *Faostat*. Statistik der FAO, 09. Januar 2008.
Homepage: <http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html?item=44&lang=en&year=2005>
- Felsenstein J.** (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fokou P.A.** (2006): Chemical investigation of three plants used in cameroonian traditional medicine: *Maesopsis eminii* (Rhamnaceae), *Autranella congolensis* (Sapotaceae) and *Pentadesma grandifolia* (Guttiferae). *Dissertation*, Universität Bielefeld.
- Fraaije M.W., N.M. Kamerbeeka, W.J.H. van Berkelb, D.B. Janssen** (2002): Identification of a Baeyer-Villiger monooxygenase sequence motif. *FEBS Letters* 518: 43-47.
- Frei P.F., K.G. Gindro, H. Richter, S. Schurch** (2007): Direct-PCR detection and epidemiology of *Ramularia collo-cygni* associated with barley necrotic leaf spots. *Journal of Phytopathology* 155 (5): 281-288.

- Friedhoff P., A. Schneider, E.M. Mandelkow, E. Mandelkow** (1998): Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution. *Biochemistry* 37 (28): 10223-10230.
- Garbo G.M.** (1996): Purpurins and benzochlorins as sensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 34 (2-3): 109-116.
- Garcia-Urdiales E., I. Alfonso, V. Gotor** (2005): Enantioselective enzymatic desymmetrizations in organic synthesis. *Chemical Reviews* 105: 313-354.
- Gareis M.** (2006): Diagnostischer Zellkulturtest (MTT-Test) für den Nachweis von zytotoxischen Kontaminanten und Rückständen. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 2006 (1): 354-363.
- Gaube F., S. Wölfl, L. Pusch, T.C. Kroll, M. Hamburger** (2007): Gene expression profiling reveals effects of *Cimicifuga racemosa* (L.) NUTT. (black cohosh) on the estrogen receptor positive human breast cancer cell line MCF-7. *BMC Pharmacology* 7: 11.
- Geisler G.** (1988): Pflanzenbau: ein Lehrbuch - Biologische Grundlagen und Techniken der Pflanzenproduktion. Berlin, Hamburg, 2.Auflage, *Paul Parey Verlag*.
- Gill M.** (2001): The biosynthesis of pigments in basidiomycetes. *Australian Journal of Chemistry* 54: 721-734.
- Goodwin S.B., L.D. Dunkle, V.L. Zismann** (2001): Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Phytopathology* 91 (7): 648-658.
- Gottschaldt M., A. Peiffer, D. Koth, H. Görls, H.-M. Dahse, U. Möllmann, M. Obata, S. Yano** (2006): Silver (I) complexes based on novel tripodal thioglycosides: synthesis, structure and microbial activity. *Tetrahedron* 62: 11073-11080.
- Gritsan N.P. & L.S. Klimenko** (1993): Photochromism of quinoid compounds: properties of photo-induced ana-quinones. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 70:103-117.
- Grosch W. & G. Laskawy** (1979): Co-oxidation of carotenes requires one soybean lipoxygenase isoenzyme. *Biochimica Biophysica Acta* 575: 439-445.
- Hall T.A.** (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis programm for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Research Symposium Series* 41: 95-98.
- Han Y.-S., R. van der Heijden, R. Verpoorte** (2001): Biosynthesis of anthraquinones in cell cultures of the Rubiaceae. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67: 201-220.

- Hartley J.A., S.M. Forrow, R.L. Souhami, K. Reszka, J.W. Lown** (1990): Photosensitization of human leukemic cells by anthracenedione antitumor agents. *Cancer Research* 50: 1936-1940.
- Harvey I.C.** (2002): Epidemiology and control of leaf and awn spot of barley caused by *Ramularia collo-cygni*. *New Zealand Plant Protection* 55: 331-335.
- Havis N.D., S.J.P. Oxley, S.R. Piper, S.R.H. Langrell** (2006): Rapid nested PCR-based detection of *Ramularia collo-cygni* direct from barley. *FEMS Microbiology Letters*. 256 (2): 217-223.
- Heinisch L., S. Wittmann, T. Stoiber, A. Berg, D. Ankel-Fuchs, U. Möllmann** (2002): Highly antibacterial active aminoacyl penicillin conjugates with acylated bis-catecholate siderophores based on secondary diamino acids and related compounds. *Journal of Medical Chemistry* 45: 3032-3040.
- Heiser I., W. Oßwald, E.F. Elstner** (1998): The formation of reactive oxygen species by fungal and bacterial phytotoxins. *Plant Physiology and Biochemistry* 36 (10): 703-713.
- Heiser I., E. Sachs, B. Liebermann** (2003): Photodynamic oxygen activation by rubellin D, a phytotoxin produced by *Ramularia collo-cygni* (SUTTON ET WALLER). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 29-36.
- Heiser I.** (2005): Sauerstoffeinwirkung als zentraler Wirkmechanismus pilzlicher Elicitoren und Phytotoxine. *Habilitationsschrift*, Technische Universität München-Weihenstephan.
- Henry K.M. & C.A. Townsend** (2005): Synthesis and fate of o-carboxybenzophenones in the biosynthesis of aflatoxin. *Journal of the American Chemical Society* 127: 3300-3309.
- Heß M., R. Habeker, M. Kick, M. Martin, H. Hausladen** (2007): Occurrence of the late leaf spot complex of barley and its consequences on optimized disease control. *Gesunde Pflanzen* 59 (2): 47-54.
- Heuser T. & W. Zimmer** (2002): Quantitative analysis of phytopathogenic ascomyota on leaves of pedunculate oaks (*Quercus robur* L.) by real-time PCR. *FEMS Microbiology Letters* 209: 295-299.
- Hilker M. & S. Schulz** (1991): Anthraquinones in different developmental stages of *Galeruca tanacetii* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Journal of Chemical Ecology* 17 (11): 2323-2332.
- Hippeli S., I. Heiser, E.F. Elstner** (1999): Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: new insights and analogies between animals and plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 37 (3): 167-178.
- Hoffmann G.M., F. Nienhaus, H.-M. Poehling, F. Schönbeck, H.C. Weltzien, H. Wilbert** (1994): Lehrbuch der Phytomedizin. 3. Auflage, Berlin. *Blackwell Wissenschaftsverlag*.

- Hopwood D.A.** (1997): Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chemical Reviews* 97: 2465-2498.
- Huang Q., G. Lu, H.M. Sben, M.C.M. Cbung, C.N. Ong** (2007): Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb. *Medicinal Research Reviews* 27 (5): 609-630.
- Huelsenbeck J.P., J.J. Bull, C.W. Cunningham** (1996): Parametric bootstrapping in molecular phylogenetics: applications and performance. In: Ferrais J.D. & S.R. Palumbi [Eds.] *Molecular Zoology: Advances, Strategies and Protocols*. Wiley-Liss. 19-45.
- Huss H., H. Mayrhofer, W. Wetschnig** (1987): *Ophiocladium hordei* CAV. (Fungi imperfecti), ein für Österreich neuer parasitischer Pilz der Gerste. *Der Pflanzenarzt* 40 (7-8): 11-13.
- Huss H., H. Mayrhofer, E. Ingolic** (1992): *Ramularia collo-cygni* SUTTON & WALLER (Fungi imperfecti), ein wirtschaftlich bedeutender Parasit der Gerste in der Steiermark. *Mitteilungen des naturwissenschaftlichen Vereins für die Steiermark* 122: 87-95.
- Huss H. & G. Neuhold** (1995): *Ramularia collo-cygni* (Fungi imperfecti) - Der Erreger der Sprengelkrankheit der Gerste. *Berichte der 46. Arbeitstagung der Arbeitsgemeinschaft der Saatzuchtleiter im Rahmen der Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter in Gumpenstein* 197-199.
- Huss H. & E. Sachs** (1998): *Ramularia*-Blattflecken- oder Sprengelkrankheit der Gerste. *Der Pflanzenarzt* 51 (11-12): 15-18.
- Itokawa H., Z.Z. Ibraheim, Y.F. Qiao, K. Takeya** (1993): Anthraquinones, naphthohydroquinones and naphthohydroquinones dimers from *Rubia cordifolia* and their cytotoxic activity. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 41 (10): 1869-1872.
- Jost L.M., J.M. Kirkwood, T.L. Whiteside** (1992): Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. *Journal of Immunology Methods* 147 (2):153-165.
- Kagedal K., D. Bironaite, K. Ollinger** (1999): Anthraquinone cytotoxicity and apoptosis in primary cultures of rat hepatocytes. *Free Radical Research* 31 (5): 419-428.
- Kenneth H.R.** [Ed.] (2001): Westcott's Plant Disease Handbook. *Kluwer Academic Publishers Group*, Dortrecht, Niederlande, 6. Auflage.
- Khodaparast A. & B. Braun** (2005): *Ramularia uredinicola* - a new species from Iran. *Mycotaxon* 91: 357-359.
- Kimura M.** (1980): A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.

- Koceva-Chyla A., B. Wieclawska, Z. Jozwiak, M. Bryszewska** (2005): Mechanisms of induction of apoptosis by anthraquinone anticancer drugs aclarubicin and mitoxantrone in comparison with doxorubicin: Relation to drug cytotoxicity and caspase-3 activation. *Apoptosis* 10 (6): 1497-1514.
- Koceva-Chyla A., B. Wieclawska, Z. Jozwiak, M. Bryszewska** (2006): Combined effect of low-power laser irradiation and anthraquinone anticancer drug aclarubicin on survival of immortalized cells: Comparison with mitoxantrone. *Cell Biology International* 30 (8): 645-652.
- Kroken S., N.L. Glass, J.W. Taylor, O.C. Yoder, B.G. Turgeon** (2003): Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *PNAS* 100 (26): 15670-15675.
- Kruedener S., H. Schempp, E.F. Elstner** (1995): Gas chromatographic differentiation between myeloperoxidase activity and fenton-type oxidants. *Free Radicals in Biology and Medicine* 19: 141-146.
- Kuo Y.C., C.M. Sun, J.C. Ou, W.J. Tsai** (1997): A tumor cell growth inhibitor from *Polygonum hypoleucum* OHWI. *Life Sciences* 61 (23): 2335-2344.
- Lange C., N. Holzhey, B. Schönecker, R. Beckert, U. Möllmann, H.-M. Dahse** (2004): W-Pyridiniumalkylethers of steroidal phenols: new compounds with potent antibacterial and antiproliferative activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12: 3357-3362.
- Lenta B.N., B. Weniger, C. Antheaume, D.T. NOUNGOU, S. Ngouela, J.C.N. Assob, C. Vonthron-Senecheau, P.A. Fokou, K.P. Devkota, E. Tsamo, N. Sewald** (2007): Anthraquinones from the stem bark of *Stereospermum zenkeri* with antimicrobial activity. *Phytochemistry* 68: 1595-1599.
- Levin H., R. Hazenfratz, J. Friedman, D. Palevitch, M. Perl** (1988): Partial purification and some properties of an antibacterial compound from *Aloe vera*. *Phytotherapy Research* 2 (2): 67-69.
- Li Z., L.J. Li, Y. Sun, J. Li** (2007): Identification of natural compounds with anti-hepatitis B virus activity from *Rheum palmatum* L. ethanol extract. *Chemotherapy* 53 (5): 320-326.
- Liebermann B., R.P. Nussbaum, W. Günther, J.M. Teuscher** (2001): Biosynthesis of the bicycloalternarenes, mixed terpenoids of *Alternaria alternata*. *Phytochemistry* 56 (6): 551-557.
- Lown J.W.** (1993): Anthracycline and anthraquinone anticancer agents - current status and recent developments. *Pharmacology & Therapeutics* 60 (2): 185-214.

- Luckner M.** (1990): Secondary metabolism in microorganism, plants and animals. 3. Auflage, Jena. *Gustav Fischer Verlag*.
- Makepeace J.C., S.J.P. Oxley, N.D. Havis, R. Hackett, J.I. Burke, J.K.M. Brown** (2007): Associations between fungal and abiotic leaf spotting and the presence of mlo alleles in barley. *Plant Pathology* 56: 934-942.
- Manojlovic N.T., S. Solujic, S. Sukdolak, L.J. Krstic** (2000): Isolation and antimicrobial activity of anthraquinones from some species of the lichen genus *Xanthoria*. *Journal of the Serbian Chemical Society* 65 (8): 555-560.
- Manuelian T., J. Hellwage, S. Meri, J. Caprioli, M. Noris, S. Heinen, M. Jozsi, H.P.H. Neumann, G. Remuzzi, P.F. Zipfel** (2003): Mutations in factor H reduce binding affinity to C3b and heparin and surface attachment to endothelial cells in hemolytic uremic syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 111 (8): 1181-1190.
- Markham J.E. & J. Hille** (2001): Host-selective toxins as agents of cell death in plant-fungus interactions. *Molecular Plant Pathology* 2: 229-239.
- Marzocchi M.P., A.R. Mantini, M. Casu, G. Smulevich** (1998): Intramolecular hydrogen bonding and excited state proton transfer in hydroxyanthraquinones as studied by electronic spectra, resonance Raman scattering, and transform analysis. *Journal of Chemical Physics* 108 (2): 534-549.
- Matsuda H., H. Shimoda, T. Morikawa, M. Yoshikawa** (2001): Phytoestrogens from the roots of *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae): structure-requirement of hydroxyanthraquinones for estrogenic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 11: 1839-1842.
- Mayorga M.E. & W.E. Timberlake** (1992): The developmentally regulated *Aspergillus nidulans* wA gene encodes a polypeptide homologous to polyketide and fatty acid synthases. *Molecular and General Genetics* 235: 205-212.
- Michal G.** [Ed.] (1999): Biochemical Pathways. Heidelberg, Berlin, *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*.
- Mihovilovic M.D., B. Müller, P. Stanetty** (2002): Monooxygenase-mediated Baeyer-Villiger oxidations. *European Journal of Organic Chemistry* 2002: 3711-3730.
- Mitchell R.E.** (1984): The relevance of non-host-specific toxins in the expression of virulence by pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 22: 215-245.
- Montoya S.C.N., L.R. Comini, M. Sarmiento, C. Becerra, I. Albesa, G.A. Arguello, J.L. Cabrera** (2005): Natural anthraquinones probed as Type I and Type II photosensitizers:

- singlet oxygen and superoxide anion production. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 78 (1): 77-83.
- Mosmann T.** (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods* 65: 55-63.
- Nain M., F. Hinder, J.H. Gong, A. Schmidt, A. Bender, H. Sprenger, D. Gemsä** (1990): Tumor necrosis factor-alpha production of influenza A virus-infected macrophages and potentiating effect of lipopolysaccharides. *Journal of Immunology* 145 (6): 1921-1928.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)** (2000): Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 5. Edition, Villanova, in NCCLS, Approved standard Document M7-A5.
- O'Hagen D.** (1995): Biosynthesis of fatty acid and polyketides metabolites. *Natural Product Reports* 12: 1-32.
- Olsen C.M., E.T. Meussen-Elholm, M. Samuelsen, J. A. Holme, J.K. Hongslo** (2003): Effects of the environmental estrogens bisphenol A, tetrachlorobisphenol A, tetrabromobisphenol A, 4-hydroxybiphenyl and 4,4'-dihydroxybiphenyl on oestrogen receptor binding, cell proliferation and regulation of oestrogen sensitive proteins in the human breast cancer cell line MCF-7. *Pharmacology & Toxicology* 92:180-188.
- Onegi B., C. Kraft, I. Kohler, M. Freund, K. Jenett-Siems, K. Siems, G. Beyer, M.F. Melzig, U. Bienzele, E. Eich** (2002): Herbal remedies traditionally used against malaria part VI - Antiplasmodial activity of naphthoquinones and one anthraquinone from *Stereospermum kunthianum*. *Phytochemistry* 60 (1): 39-44.
- Oxley S.J.P., N.D. Havis, R. Hackett** (2007): Impact of fungicides and varietal resistance on *Ramularia collo-cygni* in spring barley. *Proceedings of the 1st European Ramularia Workshop*, Göttingen, 13.-14. März 2006, 34.
- Raiser E.** (1999): Schwarzbraun gesprenkelt - *Ramularia*-Pilz an Gerste anzutreffen. *BW agrar* 25: 19.
- Panaccione D.G., R.D. Johnson, J.B. Rasmussen, T.L. Friesen** (2002): Fungal Phytotoxins. In: *The Mycota XI. Agricultural Applications*. Kempken et al. [Eds.]. Berlin, Heidelberg. *Springer Verlag*.
- Pankewitz F., A. Zöllmer, M. Hilker, Y. Gräser** (2007): Presence of *Wolbachia* in insect eggs containing antimicrobially active anthraquinones. *Microbial Ecology* 54: 713-721.
- Pauwels R., J. Balzarini, M. Baba, R. Snoeck, D. Schols, P. Herdewijn, J. Desmyter, E. de Clercq** (1988): Rapid and automated tetrazolium-based calorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *Journal of Virological Methods* 20: 309-321.

- Pfeiffer P., S. Cold, C. Rose** (1992): Cytotoxic treatment of metastatic breast cancer. Which drugs and drug combinations to use? *Acta Oncologica* 31 (2): 219-224.
- Pickhardt M., Z. Gazova, M. von Bergen, I. Khlistunova, Y.P. Wang, A. Hascher, E.M. Mandelkow, J. Biernat, E. Mandelkow** (2005): Anthraquinones inhibit tau aggregation and dissolve Alzheimer's paired helical filaments in vitro and in cells. *Journal of Biological Chemistry* 280 (5): 3628-3635.
- Prell H.H. & P.R. Day** (2001): Plant-fungal pathogen interaction. A classical and molecular view. Berlin. *Springer Verlag*.
- Quast H. & H.-L. Fuchsbauer** (1986): Electron-spin-resonance spectroscopic detection of intramolecular interactions in radical cations of poly(alpha-methoxy)tritylenes. *Chemische Berichte* 119: 1016-1038.
- Roberts S.M. & P.W.H. Wan** (1998): Enzyme-catalysed Baeyer-Villiger oxidations. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 4: 111-136.
- Roche Diagnostics** (2005a): Cell Proliferation Kit I (MTT), Package Insert, Version 09/2005. Mannheim, *Roche Diagnostics*.
- Roche Diagnostics** (2005b): Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Package Insert, Version 07/2005. Mannheim, *Roche Diagnostics*.
- Roehm N.W., G.H. Rodgers, S.M. Hatfield, A.L. Glasebrook** (1991): An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT *Journal of Immunological Methods* 142: 257-265.
- Roslund M.U., O. Aitio, J. Wärna, H. Maaheimo, D.Y. Murzin, R. Leino** (2008): Acyl group migration and cleavage in selectively protected β -D-Galactopyranosides as studied by NMR spectroscopy and kinetic calculations. *Journal of the American Chemical Society* 130 (27): 8769-8772.
- Rudolph K.** (1976): Non-specific toxins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 4: 270-315.
- Sachs E., D. Amelung, K. Klappach** (1998): Die Symptome der Netzfleckenkrankheit der Gerste, hervorgerufen durch *Drechslera teres* (SACC.) SHOEM., und deren Verwechslungsmöglichkeiten. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 50: 58-63.
- Sachs E.** (2002): Neue Gerstenkrankheit auf dem Vormarsch. *Land & Forst* 24: 8-9.
- Sachs E.** (2006): The history of research into *Ramularia* leaf spot on barley. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 58 (7): 186-187.

- Saitou N. & M. Nei** (1987): The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Salamati S. & M. Nyman** (2008): *Ramularia collo-cygni* also an *Asteromella*. 3rd *International Workshop of Barley Leaf Blights*. Edmonton, Canada. 23-27. Juli 2006. 180.
- Salamati S. & L. Reitan** (2007): *Ramularia collo-cygni* on spring barley, an overview of its biology and epidemiology. *Proceedings of the 1st European Ramularia Workshop*, Göttingen, 13.-14. März 2006, 13.
- Sambrook J. & D.W. Russell** (2001): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Schastak S., B. Gitter, R. Handzel, R. Hermann, P. Wiedemann** (2008): Improved photoinactivation of gram-negative and gram-positive methicillin-resistant bacterial strains using a new near-infrared absorbing meso-tetrahydroporphyrin: a comparative study with a chlorine e6 photosensitizer ‘‘Photolon’’. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 29 (30): 1-5.
- Schinazi R.F., C.K. Chu, J.R. Babu, B.J. Oswald, V. Saalman, D.L. Cannon, B.F. Eriksson, M. Nasr** (1990): Anthraquinones as a new class of antiviral agents against human immunodeficiency virus. *Antiviral Research* 13: 265-272.
- Schlösser E.** (1997): Allgemeine Phytopathologie. 2. Auflage, Stuttgart, New York. *Thieme Verlag*.
- Schmidtke M., U. Schnittler, B. Jahn, H.-M. Dahse, A. Stelzner** (2001): A rapid assay for evaluation of antiviral activity against coxsackie virus B3, influenza virus A, and herpes simplex virus type 1. *Journal of Virological Methods* 95: 133-143.
- Schubert K., U. Braun, J.Z. Groenewald, P.W. Crous** (2007): *Cladosporium* leaf-blotch and stem rot of *Paeonia spp.* caused by *Dichocladosporium chlorocephalum* gen. nov. *Studies in Mycology* 58: 95-104.
- Schümann J. & C. Hertweck** (2006): Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes. *Journal of Biotechnology* 124 (4): 690-703.
- Schweitzer C. & R. Schmidt** (2003): Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chemical Reviews* 103: 1685-1757.
- Scudiero D.A., R.H. Shoemaker, K.D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T.H. Nofziger, M.J. Currens, D. Seniff, M.R. Boyd** (1988): Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research* 48 (17): 4827-4833.

- Semple S.J., S.M. Pyke, G.D. Reynolds, R.L.P. Flower** (2001): *In vitro* antiviral activity of the anthraquinone chrysophanic acid against poliovirus. *Antiviral Research* 49 (3): 169-178.
- Sherdian J.E.** (2000): Cereal diseases 1999-2000 (Including pea diseases and gooseberry mildew) - Disease survey and disease control in the Wairarapa, New Zealand, *Plant Doctors Ltd.* 37: 1-38.
- Simpson T.J.** (1995): Polyketide biosynthesis. *Chemistry & Industry* 11: 407-411.
- Sprague R.** (1964): Additions to the fungi imperfecti on grasses in the United States. *Mycologia* 38: 52-64.
- Srinivas G., S. Babykutty, P.P. Satbiadevan, P. Srinivas** (2007): Molecular mechanism of emodin action: transition from laxative ingredient to an antitumor agent. *Medicinal Research Reviews* 27 (5): 591-608.
- Staunton J. & K.J. Weissman** (2001): Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Product Reports* 18 (4): 380 - 416.
- Stewart E.L., Z. Liu, P.W. Crous, L. Szabo** (1999): Phylogenetic relationship among some cercosporoid anamorphs of *Mycosphaerella* based on rDNA sequence analysis. *Mycological Research* 103: 1491-1499.
- Strange R.N.** (2007): Phytotoxins produced by microbial plant pathogens. *Natural Product Reports* 24: 127-144.
- Sutton B.C. & J.M. Waller** (1988): Taxonomy of *Ophiocladium hordei*, causing leaf lesions on triticale and other Gramineae. *Transactions of the British Mycological Society* 90 (1): 55-61.
- Sutton B.C.** (1991): *Ramularia collo-cygni*. IMI descriptions of fungi and bacteria No. 1039. *Mycopathologia* 114: 61-62.
- Swofford D.L.** (2003): PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). *Sinauer Associates*, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura K., J. Dudley, M. Nei, S. Kumar** (2007): MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Thomas R.** (2001): A biosynthetic classification of fungal and streptomycete fused-ring aromatic polyketides. *Chembiochem* 2 (9): 612-627.
- Tschöpe O. & E. Sachs** (2001): Die Farbstoffbildung von *Ramularia collo-cygni* SUTTON ET WALLER als Grundlage für die Schnell diagnose. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 53 (7): 161-164.
- Van Beilen J.B., F. Mourlane, M.A. Seeger, J. Kovac, Z. Li, T.H.M. Smits, U. Fritsche, B. Witholt** (2003): Cloning of Baeyer-Villiger monooxygenases from *Comamonas*,

- Xanthobacter* and *Rhodococcus* using polymerase chain reaction with highly degenerate primers. *Environmental Microbiology* 5 (3): 174-182.
- Van Eijk G.W. & H.J. Roeymans** (1981): Ravenelin, chrysophanol, and helminthosporin, pigments from *Drechslera holmii* and *Drechslera ravenelii*. *Experimental Mycology* 5: 373-375.
- Wägele J.W.** (2001): Grundlagen der Phylogenetischen Systematik. 2. Auflage. München. Verlag Dr. Friedrich Pfeil.
- Walters D.R., N.D. Havis, S.J.P. Oxley** (2008): *Ramularia collo-cygni*: the biology of an emerging pathogen of barley. *FEMS Microbiology Letters* 279 (1): 1-7.
- Walton J.D.** (1996): Host-selective toxins: agents of compatibility. *Plant Cell* 8: 1723-1733.
- Wang H.-H. & J.-G. Chung** (1997): Emodin-induced inhibition of growth and DNA damage in the *Helicobacter pylori*. *Current Microbiology* 35: 262-266.
- White T.J., T. Bruns, S. Lee, J. Taylor** (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White [Eds.]: PCR protocols: a guide to methods and applications. *Academic Press*, San Diego 315-322.
- Wolpert T.J., L.D. Dunkle, L.M. Ciuffetti** (2002): Host-selective toxins and avirulence determinants: What's in a Name? *Annual Review of Phytopathology* 40: 251-85.
- Wright J.L.C., T. Hu, J.L. McLachlan, J. Needham, J.A. Walter** (1996): Biosynthesis of DTX-4: confirmation of a polyketide pathway, proof of a Baeyer-Villiger oxidation step, and evidence for an unusual carbon deletion process. *Journal of the American Chemical Society* 118: 8757-8758.
- Wu Y.X. & A. von Tiedemann** (2002): Evidence for oxidative stress involved in physiological leaf spot formation in winter and spring barley. *Phytopathology* 92 (2): 145-155.
- Wube A.A., F. Bucar, K. Asres, S. Gibbons, L. Rattray, S.L. Croft** (2005): Antimalarial compounds from *Kniphofia foliosa* roots. *Phytotherapy Research* 19 (6): 472-476.
- Yagi A., K. Makino, I. Nishioka** (1977): Studies on the constituents of *Aloe saponaria* HAW. II. The structures of tetrahydroanthracene derivatives, aloesaponol III and -IV. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 25 (7): 1764-1770.
- Yoder O.C., V. Macko, T.J. Wolpert, B.G. Turgeon** (1997): *Cochliobolus spp.* and their host-specific toxins. In: The Mycota V. Plant Relationships. Carroll G., P. Tudzynski [Eds.], Berlin. *Springer Verlag*.

- Youngman R.J., H. Schieberle, H. Schnabel, W. Grosch, E.F. Elstner** (1983): The photodynamic generation of singlet molecular oxygen by the fungal phytotoxin, cercosporin. *Photobiochemistry and Photobiology* 6: 109-119.
- Zadoks J.C., T.T. Chang, C.F. Konzak** (1974): A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14: 415-421.
- Zaffarano P. L., B.A. McDonald, M. Zala, M., C.C. Linde** (2006): Global hierarchical gene diversity analysis suggests the fertile crescent is not the center of origin of the barley scald pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Phytopathology* 96 (9): 941-950.

Anhang

A. I. IUPAC-Nomenklatur³

Die Nomenklatur der isolierten Verbindungen erfolgte nach den gültigen IUPAC-Regeln mit Hilfe der Software ACD/ChemSketch (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada) bzw. durch Dr. U. Roessler (FIZ Chemie, Berlin).

Rubellin A

3,6,10,13,15-Pentahydroxy-8-methyl-3,3a,11,19c-tetrahydrobenzo[e]naphtho[2',3':5,6]fluoreno[1,9a-b]oxepin-5,14,19(10H)-trion

Rubellin B

3,6,10,13,15,18-Hexahydroxy-8-methyl-3,3a,11,19c-tetrahydrobenzo[e]naphtho[2',3':5,6]fluoreno[1,9a-b]oxepin-5,14,19(10H)-trion

Rubellin C

4,6,9,10-Tetrahydroxy-8a-(4-hydroxy-6-methyl-3-oxo-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-yl)-8a,9,10,12a-tetrahydro-5H-indeno[1,2-a]anthracen-5,13(8H)-dion

Rubellin D

1,4,6,9,10-Pentahydroxy-8a-(4-hydroxy-6-methyl-3-oxo-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-yl)-8a,9,10,12a-tetrahydro-5H-indeno[1,2-a]anthracen-5,13(8H)-dion

14-Dehydrorubellin D

1,4,6,9-Tetrahydroxy-8a-(4-hydroxy-6-methyl-3-oxo-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-yl)-8,8a,9,12a-tetrahydro-5H-indeno[1,2-a]anthracen-5,10,13-trion

Rubellin E

2-Hydroxy-6-[hydroxy(1,4,6,9,10-pentahydroxy-5,13-dioxo-5,8,9,10,12a,13-hexahydro-8aH-indeno[1,2-a]anthracen-8a-yl)methyl]-4-methylbenzoesäure

Rubellin F

2-Hydroxy-6-[hydroxy(4,6,9,10-tetrahydroxy-5,13-dioxo-5,8,9,10,12a,13-hexahydro-8aH-indeno[1,2-a]anthracen-8a-yl)methyl]-4-methylbenzoesäure

Caeruleoramularin I

3,6,10,13,15-Pentahydroxy-8-methyl-3,3a,11,19c-tetrahydrobenzo[e]naphtho[2',3':5,6]fluoreno[1,9a-b]oxepin-5,14,18(10H)-trion

³ Nummerierung der Atompositionen nach IUPAC-Nomenklatur entspricht nicht der von Arnone et al. (1986, 1989)

Caeruleoramularin II

4,6,9,10-Tetrahydroxy-8a-(4-hydroxy-6-methyl-3-oxo-1,3-dihydro-2-benzofuran-1-yl)-
8a,9,10,12a-tetrahydro-1H-indeno[1,2-a]anthracen-1,5(8H)-dion

Helminthosporin

1,5,8-Trihydroxy-3-methylanthra-9,10-chinon

Chrysophanol

1,8-Dihydroxy-3-methylanthra-9,10-chinon

Uredinorubellin I⁴

5c,15-Dihydro-1,4,8,8a,10,14,17-heptahydroxy-12-methyl-cyclopenta[2,1-a:3,4-d']
dianthracen-5,9,18(8aH)-trion

Uredinorubellin II⁴

5c,15-Dihydro-1,4,8a,10,14,17-hexahydroxy-12-methyl-cyclopenta[2,1-a:3,4-d']dianthracen-
5,9,18(8aH)-trion

⁴ Benennung durch Dr. U. Roessler (FIZ Chemie,
Berlin)

A. II. NMR 2D-KorrelationsdatenTabelle A.1: ^1H - ^1H -COSY-, selektives ^1H - ^1H -TOCSY- und ^{13}C - ^1H -HMBC-Korrelationsdaten von Rubellin A (THF- d_8 , 30 °C).

^{13}C-^1H-HMBC
C-1 und C-4a mit C-3-H
C-4 mit C-2-H
C-5 mit C-7-H und C-11-H
C-6 mit C-11-H, C-17-H ₂ und C-18-H
C-8 und C-8a mit C-7-H
C-9a mit C-2-H und C-4-H
C-10 und C-10a mit C-4-H
C-11 mit C-12-H, C-13-H, C-14-H, C-18-H und C-17-H (δ 3,02)
C-12 mit C-11-H
C-13 mit C-11-H, C-14-H und C-15-H
C-14 mit C-12-H, C-13-H und C-15-H
C-15 mit C-13-H, C-14-H, C-17-H ₂ und C-18-H
C-16 mit C-11-H, C-12-H, C-14-H, C-15-H, C-18-H und C-17-H ₂
C-17 mit C-7-H, C-11-H, C-15-H und C-18-H
C-18 mit C-11-H, C-15-H und C-17-H ₂
C-19 mit C-18-H
C-20 mit C-18-H, C-22-H und C-26-H ₃
C-21 mit C-26-H ₃
C-22 mit C-20-H und C-26-H ₃
C-23 mit C-22-H
C-24 mit C-18-H, C-20-H und C-22-H
C-25 mit C-15-H → Kopplung nur im 7-gliedrigen Lactonring möglich
C-26 mit C-20-H und C-22-H
^1H-^1H-COSY
C-3-H mit C-2-H und C-4-H
C-7-H mit C-17-H ₂
C-11-H mit C-12-H und C-13-H
C-14-H mit C-13-H und C-15-H
C-17-H ₂ miteinander
C-18-H mit C-17-H ₂ und C-20-H
C-26-H ₃ mit C-20-H und C-22-H
selektives ^1H-^1H-TOCSY
C-14-H (δ 4,39) mit C-15-H (starkes Signal) und C-11-H, C-18-H, C-13-H, C-12-H und C-17-H (δ 3,99) (schwaches Signal)

Tabelle A.2: ^1H - ^1H -COSY-, ^1H - ^1H -NOESY- und ^{13}C - ^1H -HMBC-Korrelationsdaten von Rubellin B (THF- d_8 , 30 °C).

^{13}C-^1H-HMBC
C-1, C-4 und C-4a mit C-2-H und C-3-H
C-2 und C-10 mit C-3-H
C-3 und C-9a mit C-2-H
C-5 mit C-7-H, C-11-H, C-12-H, und C-17-H ₂
C-6 mit C-11-H, C-17-H ₂ und C-18-H
C-7 mit C-17-H ₂
C-8 und C-8a mit C-7-H
C-10a mit C-11-H und C-17-H ₂
C-11 mit C-12-H, C-13-H, C-14-H, C-17-H ₂ und C-18-H
C-12 mit C-11-H und C-13-H
C-13 mit C-11-H, C-14-H und C-15-H
C-14 mit C-12-H, C-13-H und C-15-H
C-15 mit C-13-H, C-14-H, C-18-H und C-17-H ₂
C-16 mit C-11-H, C-12-H, C-14-H, C-15-H, C-18-H und C-17-H ₂
C-17 mit C-7-H, C-11-H, C-15-H, C-17-H ₂ und C-18-H
C-18 mit C-11-H, C-15-H, C-17-H ₂ , C-18-H und C-20-H
C-19 mit C-18-H
C-20 mit C-18-H, C-22-H und C-26-H ₃
C-21 mit C-18-H, C-20-H und C-26-H ₃
C-22 mit C-20-H und C-26-H ₃
C-23 mit C-18-H, C-20-H und C-22-H
C-24 mit C-22-H
C-25 mit C-15-H → Kopplung nur im 7-gliedrigen Lactonring möglich
C-26 mit C-20-H und C-22-H
^1H-^1H-COSY
C-2-H mit C-3-H
C-7-H mit C-17-H ₂
C-11-H mit C-12-H und C-13-H
C-14-H mit C-13-H und C-15-H
C-17-H ₂ miteinander
C-18-H mit C-20-H
C-26-H ₃ mit C-20-H und C-22-H
^1H-^1H-NOESY
C-17-H (δ 3,04) mit C-18-H, C-7-H und C-17-H (δ 5,01)
C-17-H (δ 5,01) mit C-7-H, C-11-H und C-17-H (δ 3,04)
C-11-H mit C-12-H und C-13-H
C-7-H mit C-17-H ₂
C-26-H ₃ mit C-20-H und C-22-H
C-20-H mit C-18-H
C-18-H mit C-17-H ₂ , C-11-H und C-20-H
C-11-H mit C-12-H und C-13-H
C-14-H mit C-15-H, C-12-H und C-13-H

Tabelle A.3: ^1H - ^1H -TOCSY-, ^1H - ^1H -NOESY- und ^{13}C - ^1H -HMBC-Korrelationsdaten von Rubellin C (MeCN- d_3 , 65 °C).

^{13}C-^1H-HMBC
C-3 und C-1 mit C-2-H oder C-4-H
C-4 mit C-3-H
C-4a mit C-4-H
C-5 mit C-7-H und C-17-H ₂
C-6 und C-7 mit C-17-H ₂
C-8a mit C-7-H
C-9a mit C-3-H
C-11 mit C-12-H und C-17-H (δ 3,15)
C-12 mit C-11-H
C-14 mit C-12-H
C-15 mit C-17-H (δ 4,26) und C-13-H
C-16 mit C-18-H und C-17-H ₂
C-17 mit C-15-H, C-18-H und C-17-H ₂
C-18 mit C-20-H und C-17-H ₂
C-19 mit C-18-H
C-20 mit C-26-H ₃
C-23 mit C-22-H
C-24 mit C-18-H, C-20-H und C-22-H
C-25 und C-21 mit C-18-H
C-26 und C-22 mit C-26-H ₃ , C-22-H und C-20-H
^1H-^1H-NOESY
C-26-H ₃ mit C-20-H und C-22-H
C-20-H und C-18-H mit C-17-H ₂
C-17-H ₂ miteinander
C-14-H mit C-17-H (δ 3,15)
C-11-H mit C-12-H und C-13-H
^1H-^1H-TOCSY
C-3-H mit C-2-H und C-4-H
C-7-H mit C-17-H ₂
C-11-H mit C-12-H und C-13-H
C-14-H mit C-12-H und C-13-H
C-20-H mit C-22-H
C-22-H mit C-18-H

Tabelle A.4: ^1H - ^1H -COSY-, ^1H - ^1H -NOESY- und ^{13}C - ^1H -HMBC-Korrelationsdaten von Rubellin D (THF- d_8 30 °C).

^{13}C-^1H-HMBC
C-1, C-2 und C-4a mit C-3-H
C-3 mit C-2-H
C-4 mit C-2-H
C-5 mit C-7-H und C-17-H ₂
C-6 und C-7 mit C-17-H ₂
C-6, C-9, C-8 und C-8a mit C-7-H
C-9a mit C-2-H und C-3-H
C-10 mit C-3-H
C-11 mit C-13-H, C-17-H (δ 4,49) C-14-H und C-12-H
C-12 mit C-11-H
C-14 mit C-12-H und C-15-H
C-15 mit C-17-H (δ 4,49) C-13-H
C-16 mit C-15-H, C-18-H und C-17-H ₂
C-17 mit C-7-H, C-15-H, C-18-H und C-17-H ₂
C-18 mit C-15-H, C-17-H ₂ , C-11-H und C-22-H
C-19 mit C-18-H und C-26-H ₃
C-20 mit C-22-H und C-26-H ₃
C-21 mit C-20-H
C-22 mit C-26-H ₃ und C-20-H
C-24 und C-23 mit C-18-H, C-20-H und C-22-H
C-25 mit C-18-H und C-20-H
C-26 mit C-20-H und C-22-H
^1H-^1H-COSY
C-7-H mit C-17-H ₂
C-11-H mit C-12-H und C-13-H
C-14-H mit C-14-OH, C-15-H und C-13-H
C-15-H mit C-15-OH
C-17-H ₂ miteinander
C-22-H mit C-18-H, C-20-H und C-26-H
C-20-H mit C-26-H und C-22-H
C-26-H ₃ mit C-22-H, C-20-H und C-26-H ₃
^1H-^1H-NOESY
C-26-H ₃ mit C-20-H und C-22-H
C-17-H ₂ (δ 3,14) mit C-18-H, C-15-H, C-11-H und C-7-H
C-11-H mit C-12-H und C-13-H
C-17-H ₂ miteinander
C-12-H und C-13-H mit C-11-H und C-17-H ₂
C-20-H mit C-11-H

Tabelle A.5: ^1H - ^1H -COSY-, selektives ^1H - ^1H -TOCSY-, ^1H - ^1H -NOESY- und ^{13}C - ^1H -HMBC-Korrelationsdaten von 14-Dehydrorubellin D (THF- d_8 30 °C).

^{13}C-^1H-HMBC
C-1 und C-4a mit C-3-H
C-4 mit C-2-H
C-5 mit C-7-H und C-17-H (δ 3,42) > C-17-H (δ 3,12)
C-6 und C-7 mit C-17-H ₂
C-6, C8 und C8a mit C-7-H
C-9a mit C-2-H und C-3-H
C-11 mit C-13-H, C-17-H (δ 3,12) und C-18-H
C-12 mit C-18-H
C-14 mit C-12-H und C-15-H
C-15 mit C-17-H (δ 3,12)
C-16 mit C-15-H, C-18-H und C-17-H (δ 3,42) > C-17-H (δ 3,12)
C-17 mit C-7-H und C-15-H
C-18 mit C-15-H und C-17-H ₂
C-19 mit C-18-H
C-20 mit C-22-H und C-26-H ₃
C-21 mit C-18-H und C-26-H ₃
C-22 mit C-26-H ₃
C-24 mit C-20-H und C-22-H
C-25 mit C-18-H
C-26 mit C-22-H
^1H-^1H-COSY
C-11-H mit C-12-H und C-13-H (Allylkopplung)
C-17-H ₂ miteinander
^1H-^1H-NOESY
C-11-H mit C-12-H, C-15-H und C-18-H
C-15-H mit C-11-H, C-18-H und C-20-H
C-17-H (δ 3,12) mit C-7-H und C-17-H (δ 3,42)
C-17-H (δ 3,42) mit C-7-H, C-17-H (δ 3,12), C-18-H und C-20-H →
Fernkopplung schließt 7-gliedrigen Lactonring aus
C-26-H ₃ mit C-20-H und C-22-H
selektives ^1H-^1H-TOCSY
Anregung: C-17-H (δ 3,12)
mit C-7-H (starkes Signal)
und C-17-H (δ 3,42), C-11-H, C-15-H
und C-18-H (schwaches Signal)

Tabelle A.6: ^1H - ^1H -TOCSY-, ^1H - ^1H -NOESY- und ^{13}C - ^1H -HMBC-Korrelationsdaten von Caeruleoramularin I (DMSO- d_6 , 25 °C).

^{13}C-^1H-HMBC
C-3 und C-2-H
C-4 mit C-10-H und C-3-H
C-4a mit C-3-H und C-10-H
C-5 mit C-10-H, C-11-H und C-7-H
C-6 mit C-17-H ₂ und C-11-H
C-8 mit C-7-H
C-8a, C-10a und C-9 mit C-10-H
C-11 mit C-17-H (δ 4,80)
C-12 mit C-11-H
C-14 mit C-12-H
C-15 mit C-17-H (δ 3,00)
C-16 mit C-15-H, C-11-H, C-12-H, C-17-H ₂ und C-7-H
C-17 mit C-18-H
C-18 mit C-17-H (δ 4,80) und C-20-H
C-20 mit C-22-H und C-26-H ₃
C-21 mit C-26-H ₃
C-22 mit C-20-H, C-26-H ₃ und C-23-OH
C-23 und C-26 mit C-20-H und C-22-H
C-24 mit C-20-H, C-22-H und C-23-OH
C-25 mit C-20-H, C-22-H, C-23-OH und C-15-H
^1H-^1H-NOESY
C-10-H mit C-11-H (starke Kopplung) und C-12-H (schwache Kopplung)
^1H-^1H-TOCSY
C-2-H mit C-3-H
^1H-^1H-COSY
C-26-H ₃ mit C-20-H und C-22-H

Tabelle A.7: ^1H - ^1H -COSY-, ^1H - ^1H -NOESY- und ^{13}C - ^1H -HMBC-Korrelationsdaten von Uredinorubellin I (THF- d_8 , 30 °C).

^{13}C-^1H-HMBC
C-1 und C-4 mit C-H-2 und C-3-H
C-2 und C-4a mit C-3-H
C-3 und C-9a mit C-2-H
C-5 mit C-7-H, C-11-H, C-12-H und C-17-H ₂
C-6 mit C-11-H und C-17-H ₂
C-7 mit C-17-H ₂
C-8 und mit C-7-H und C-17-H ₂
C-9 mit C-2-H und C-7-H
C-9a mit C-2-H
C-10 mit C-3-H
C-10a mit C-7-H und C-17-H (δ 4,34)
C-11 mit C-12-H, C-13-H, C-18-H und C-17-H (δ 2,25)
C-12 mit C-11-H, C-13-H und C-14-H
C-13 mit C-11-H und C-14-H
C-14 mit C-12-H, C-13-H, C-17-H (δ 4,34) und C-18-H
C-15 mit C-13-H, C-14-H, C-17-H ₂ und C-18-H
C-16 mit C-11-H, C-12-H, C-14-H, C-18-H und C-17-H ₂
C-17 mit C-7-H, C-11-H und C-18-H
C-18 mit C-11-H, C-17-H ₂ und C-20-H
C-19 mit C-18-H, C-20-H und C-26-H ₃
C-20 mit C-18-H, C-22-H und C-26-H ₃
C-22 und C-21 mit C-20-H und C-26-H ₃
C-23 mit C-22-H, C-20-H und C-26-H ₃
C-24 mit C-18-H, C-20-H und C-22-H
C-25 mit C-14-H, C-20-H und C-22-H → Carbonylkopplung
C-26 mit C-20-H und C-22-H
^1H-^1H-COSY
C-3-H mit C-2-H
C-7-H mit C-17-H ₂
C-11-H mit C-12-H und C-13-H
C-14-H mit C-12-H und C-13-H
C-17-H ₂ miteinander
C-26-H ₃ mit C-20-H und C-22-H
^1H-^1H-NOESY
C-7-H mit C-17-H ₂ und C-18-H
C-14-H mit C-12-H, C-13-H und C-11-H
C-11-H mit C-18-H, C-12-H, C-13-H und C-17-H (δ 4,34) bzw. C-14-H (schwache Kopplung)
C-17-H (δ 4,34) mit C-11-H, C-7-H und C-17-H (δ 2,25)
C-17-H (δ 2,25) mit C-7-H, C-17-H (δ 4,34), C-18-H und C-20-H → Fernkopplung schließt 7-gliedrigen Lactonring aus
C-26-H ₃ mit C-20-H und C-22-H

Tabelle A.8: ^1H - ^1H -COSY- und ^{13}C - ^1H -HMBC-Korrelationsdaten von Uredinorubellin II (THF- d_8 , 30 °C).

^{13}C - ^1H -HMBC
C-1 mit C-2-H und C-3-H
C-2 und C-10 mit C-3-H und C-4-H
C-4 mit C-2-H
C-4a mit C-3-H
C-5 mit C-7-H, C-11-H, C-12-H und C-17-H ₂
C-6 mit C-11-H und C-17-H ₂
C-7 mit C-17-H ₂
C-8 mit C-7-H und C-17-H ₂ (δ 4,31)
C-8a mit C-7-H
C-9a mit C-4-H
C-11 mit C-12-H, C-13-H und C-17-H ₂ (δ 2,20)
C-12 mit C-11-H, C-13-H und C-14-H
C-13 mit C-11-H und C-14-H
C-14 mit C-12-H und C-13-H
C-15 mit C-13-H, C-17-H ₂ (δ 4,31) und C-18-H
C-16 mit C-11-H, C-12-H, C-14-H, C-17-H ₂ (δ 2,20) und C-18-H
C-17 mit C-7-H, C-11-H und C-18-H
C-18 mit C-11-H, C-14-H, C-17-H ₂ und C-20-H
C-19 mit C-18-H und C-26-H ₃
C-20 mit C-18-H, C-22-H und C-26-H ₃
C-21 mit C-26-H ₃
C-22 mit C-23-OH und C-26-H ₃
C-23 mit C-22-H und C-23-OH
C-24 mit C-18-H, C-20-H, C-22-H und C-23-OH
C-25 mit C-20-H
C-26 mit C-20-H und C-22-H
^1H - ^1H -COSY
C-2-H mit C-3-H und C-4-H
C-7-H mit C-17-H ₂ (δ 4,31)
C-11-H mit C-12-H, C-13-H und C-14-H
C-12-H mit C-11-H und C-14-H
C-17-H ₂ miteinander und C-7-H
C-26-H ₃ mit C-20-H und C-22-H

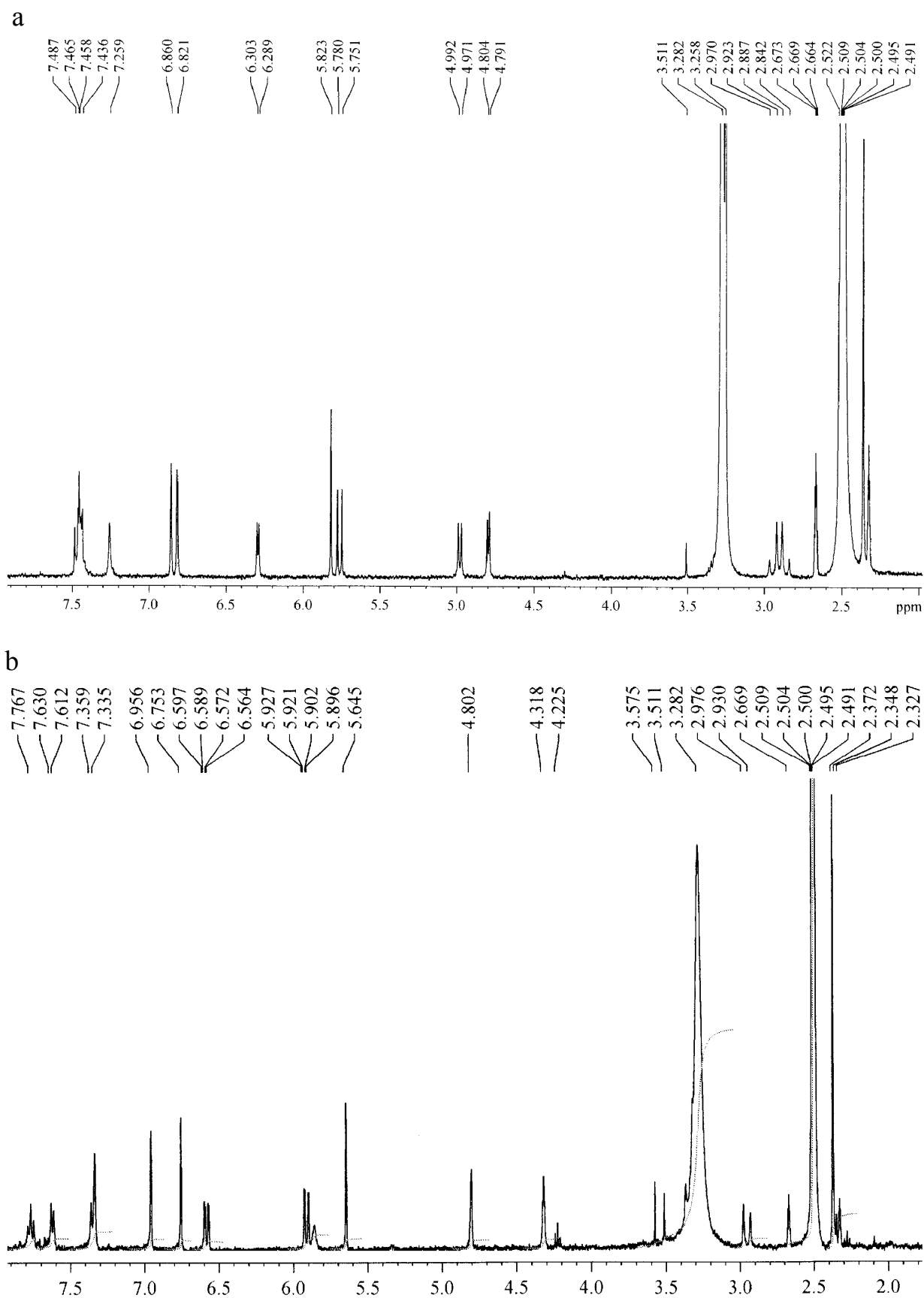


Abbildung A.1: ^1H -Spektren von Ure_4 (a) und Ure_5 (b) ($\text{DMSO}-d_6$, $30\text{ }^\circ\text{C}$).

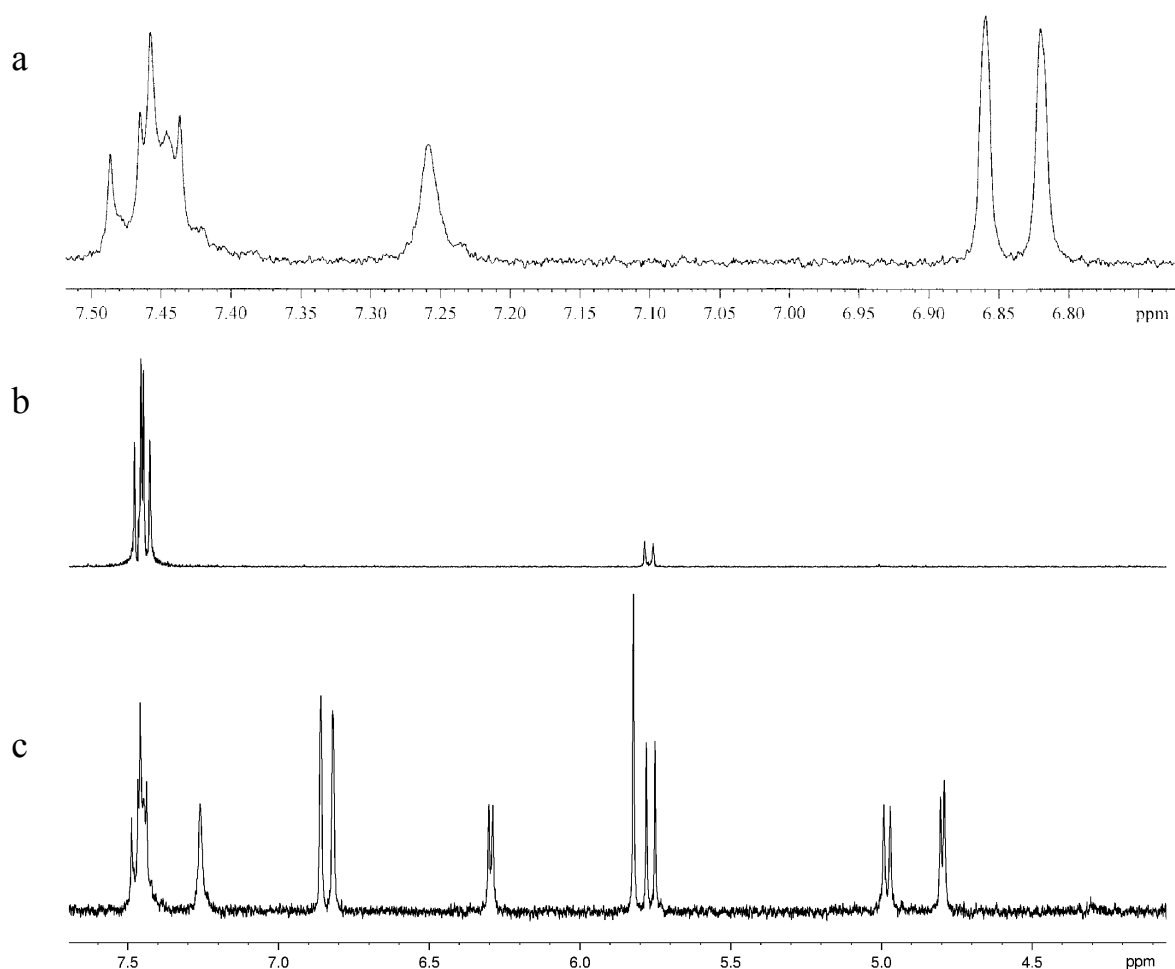


Abbildung A.2: Ausgewählte ¹H-Spektren von Ure_4 (DMSO-*d*₆, 30 °C), a) selektives ¹H-¹H-TOCSY-Spektrum, Anregung von C-12-H (δ 7,44) und dessen Kopplung zu C-13-H (δ 5,77), b) ¹H-Teilspektren im Bereich 7,5 bis 4,0 ppm und c) im Bereich 7,5 bis 6,8 ppm.

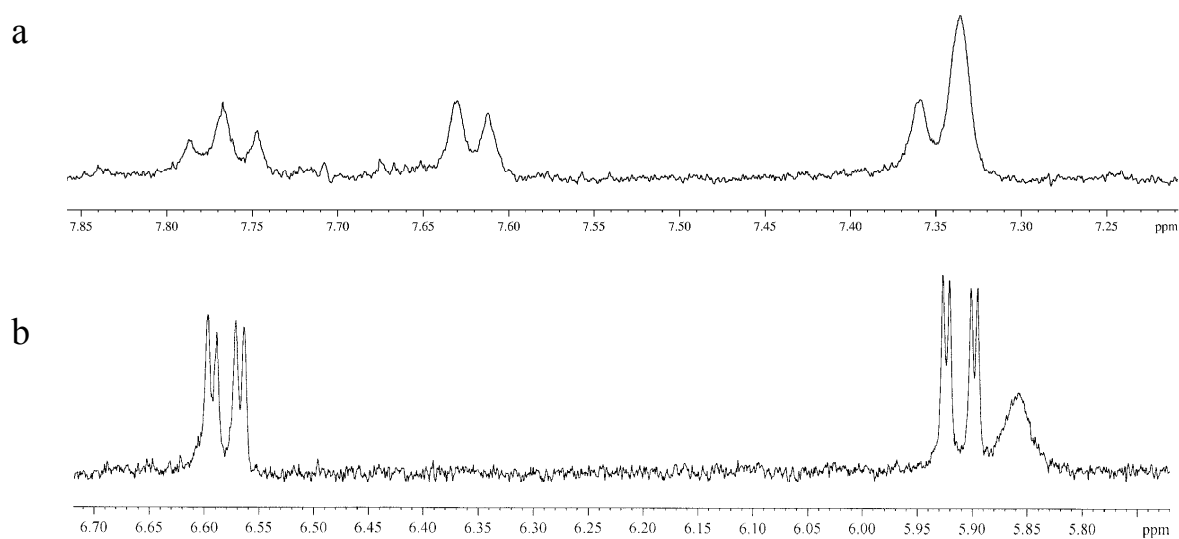


Abbildung A.3: Ausgewählte ¹H-Spektren von Ure_5 (DMSO-*d*₆, 30 °C), a) ¹H-Teilspektrum (7,85-7,25 ppm) und b) selektives ¹H-¹H-TOCSY-Spektrum, Anregung von C-12-H (δ 6,58) und dessen Kopplung zu C-13-H (δ 5,92).

A. III. IR-Messwerte**Rubellin A** (ν_{\max} [cm^{-1}]):

3489 (OH), 3039, 2926, 1695 (Lacton CO), 1671 (konjugiertes CO), 1623 (Chelat CO), 1574, 1460, 1406, 1352, 1284-1029, 981-592

Rubellin B (ν_{\max} [cm^{-1}]):

3432 (OH), 3315 (OH), 3040, 2929, 1726 (Lacton CO), 1683 (konjugiertes CO), 1602, 1570, 1450, 1406, 1287-1028, 972-591

Rubellin C (ν_{\max} [cm^{-1}]):

3433 (OH), 3041, 2926, 1738 (Lacton CO), 1667 (konjugiertes CO), 1624 (Chelat CO), 1574, 1462, 1403, 1354, 1285-1061, 963-586

Rubellin D (ν_{\max} [cm^{-1}]):

3430 (OH), 3040, 2920, 1735 (Lacton CO), 1605, 1560, 1450, 1405, 1300-1070, 965-580

Rubellin E (ν_{\max} [cm^{-1}]):

3309 (OH), 3038, 2926, 2856, 1598, 1580(sh), 1456, 1411, 1355, 1312, 1290-1047, 969-590

Rubellin F (ν_{\max} [cm^{-1}]):

3405 (OH), 3037, 2959, 2927, 1623 (Chelat CO), 1575, 1460, 1413, 1378, 1280-1052, 975-628

14-Dehydrorubellin D (ν_{\max} [cm^{-1}]):

3434 (OH), 3047, 2924, 2854, 1742 (Lacton CO), 1691 (konjugiertes CO), 1602, 1566, 1452, 1406, 1292-1054, 965-572

Caeruleoramularin I (ν_{\max} [cm^{-1}]):

3411 (OH), 2927, 2856, 1738 (Lacton CO), 1665 (konjugiertes CO), 1619 (Chelat CO), 1580, 1479, 1454, 1384, 1317, 1246-1030, 984-709

Caeruleoramularin II (ν_{\max} [cm^{-1}]):

3429 (OH), 2926, 2855, 1738 (Lacton CO), 1656, 1620 (Chelat CO), 1583, 1457, 1410, 1359, 1302-1081, 964-693

Uredinorubellin I (ν_{\max} [cm^{-1}]):

3541 (OH), 3283 (OH), 2925, 2780, 1705 (konjugiertes CO), 1627 (Chelat CO), 1599, 1569, 1449, 1403, 1341, 1312, 1291, 1221, 1178, 1110, 1064, 1041, 1002-714

Uredinorubellin II (ν_{\max} [cm^{-1}]):

3399 (OH), 3224 (OH), 2964, 2927, 2870, 1688 (konjugiertes CO), 1621 (Chelat CO), 1570, 1460, 1397, 1364, 1283, 1202, 1163, 1109, 1086, 1033, 994-728

Ure_4 (ν_{\max} [cm^{-1}]):

3537 (OH), 3414 (OH), 2927, 1728 (Lacton CO), 1711 (konjugiertes CO), 1654, 1606, 1574, 1449, 1416, 1401, 1372, 1318, 1269, 1178, 1108, 1091, 1056, 1029, 971-722

Ure_5 (ν_{\max} [cm^{-1}]):

3429 (OH), 2956, 2923, 2854, 1734 (Lacton CO), 1690 (konjugiertes CO), 1624 (Chelat CO), 1601, 1499, 1460, 1377, 1283, 1209, 1160, 1113, 1074, 1052, 963-698

A. IV. ^{13}C -Einbauraten (Fütterungsversuche)Tabelle A.9: Einbau von $[1-^{13}\text{C}]$ -Acetat (I, III) und $[2-^{13}\text{C}]$ -Acetat (II, IV) in Rubellin B und D (THF- d_8 , 30 °C).

C-Atom	Rubellin B			Rubellin D		
	^{13}C [ppm]	% $^{13}\text{C}^{\text{b}}$ (I)	% ^{13}C (II) ^a	^{13}C [ppm]	% ^{13}C (III) ^a	% ^{13}C (IV) ^a
1	157,0	23,31	4,56	158,1	25,48	4,62
2	128,7	1,23	22,22	129,9	1,39	25,29
3	129,0	21,77	4,49	130,2	27,74	3,94
4	157,9	0,79 ^c	23,88	159,0	1,31	25,76
4a	113,4	22,68	2,56	114,2	28,00	3,34
5	142,1	1,30	23,87	142,0	1,35	26,24
6	157,8	22,53	5,31	157,9	28,30	3,09
7	119,4	1,39	24,29	121,0	1,41	26,35
8	163,7	24,95	5,12	164,8	26,39	4,50
8a	113,6	1,29	25,04	114,9	1,60	28,66
9	190,7	24,57	4,96	191,7	28,22	4,82
9a	112,7	1,22	22,62	113,6	1,25	27,13
10	188,4	1,41	24,76	189,1	1,38	28,15
10a	125,6	21,78	4,54	127,5	28,53	4,07
11	48,4	1,37	23,26	48,5	1,39	25,39
12	128,5	21,90	4,13	128,8	26,52	3,59
13	125,8	1,16	22,87	126,9	1,37	24,55
14	65,2	20,15	4,33	66,7	28,57	4,29
15	81,6	1,30	24,08	69,1	1,51	26,00
16	53,6	23,11	4,32	54,2	26,54	4,28
17	39,5	1,42	24,14	38,1	1,45	26,37
18	78,6	1,40	23,31	87,1	1,41	25,99
19	143,1	23,52	4,49	149,3	28,00	4,47
20	116,5	1,40	24,30	117,0	1,39	24,53
21	145,6	23,22	4,19	148,1	26,21	4,29
22	117,5	1,38	24,29	117,6	1,37	25,63
23	160,1	23,31	4,87	157,6	24,72	2,68
24	109,1	1,25	25,28	111,2	1,20	25,18
25	172,5	23,43	4,83	169,8	26,69	4,68
26	21,0	1,26	21,73	22,2	1,28	25,13

^a ^{13}C -Abundanz wurde bestimmt von der ^{13}C -Satelliten-Analyse des Protons H-26^b ^{13}C -Abundanz wurde bestimmt von der ^{13}C -Satelliten-Analyse des Protons H-12^c unterrepräsentiert, beeinflusst durch Kohlenstoffkern C-6

Tabelle A.10: Einbau von [U-¹³C₆]-Glucose in Rubellin B und D (THF-*d*₈, 30 °C).

C-Atom	Rubellin B				Rubellin D			
	¹³ C [ppm]	% ¹³ C ^c	% ¹³ C ¹³ C ^c	J _{CC} [Hz]	¹³ C [ppm]	% ¹³ C ^b	% ¹³ C ¹³ C ^b	J _{CC} [Hz]
1	158,0	5,13	58 (2)	64	157,1	4,99	58 (2)	64
2	129,7	5,10	57 (1)	63	128,8	4,52	56 (1)	64
3	130,0	5,75	53 (4)	64	129,2	4,50	59 (4)	64
4	158,9	-	56 (3)	57	158,0	4,37	59 (3)	64
4a	114,5	4,23	59 (10)	55	113,2	3,95	60 (10)	55
5	143,1	4,83	57 (10a)	66	141,0	4,03	60 (10a)	66
6	158,8	-	63 (17)	41	156,8	4,09	58 (17)	42
7	120,4	5,55	-	-	120,1	4,67	-	-
8	164,6	5,71	56 (8a)	64	163,9	4,14	60 (8a)	64
8a	114,6	4,60	59 (8)	64	114,0	4,00	60 (8)	64
9	191,8	4,79	56 (9a)	56	190,7	4,47	59 (9a)	56
9a	113,8	4,33	58 (9)	56	112,6	3,98	59 (9)	56
10	189,5	4,69	58 (4a)	55	188,1	4,29	60 (4a)	55
10a	126,6	4,47	58 (5)	66	126,5	4,57	62 (5)	65
11	49,4	5,09	58 (12)	39	47,5	4,17	61 (12)	39
12	129,4	5,13	58 (11)	39	127,9	4,30	61 (11)	39
13	126,8	5,16	59 (14)	45	125,9	4,33	61 (14)	46
14	66,2	4,35	56 (13)	45	65,7	4,21	62 (13)	47
15	82,6	5,57	-	-	68,1	3,97	-	-
16	54,7	4,96	58 (18)	38	53,2	4,00	60 (18)	38
17	40,5	5,33	59 (6)	41	37,1	4,36	61 (6)	41
18	79,6	4,77	56 (16)	38	86,2	4,33	60 (16)	38
19	144,1	4,92	57 (20)	62	148,2	3,81	59 (20)	63
20	117,4	5,54	58 (19)	62	116,1	3,75	60 (19)	63
21	146,6	4,56	57 (26)	43	147,2	3,72	60 (26)	43
22	118,5	5,22	-	-	116,6	4,20	-	-
23	161,1	5,10	59 (24)	65	156,5	3,95	60 (24)	69
24	110,1	4,61	58 (23)	65	110,2	3,62	59 (23)	69
25	173,5	4,79	-	-	168,7	4,09	-	-
26	22,0	4,65	58 (21)	43	21,2	3,73	60 (21)	43

^a 4 %, verdünnt mit unmarkierter Glucose^b ¹³C-Abundanz wurde bestimmt von der ¹³C-Satelliten-Analyse des Protons H-22^c ¹³C-Abundanz wurde bestimmt von der ¹³C-Satelliten-Analyse des Protons H-20

A. V. Produktbildung und Bildungskinetik

Tabelle A.11: Gesamtproduktbildung (der Hauptverbindungen Rubellin B, C, D) aus Kulturfiltrat und Mycel der untersuchten Stämme von *R. collo-cygni* und *Ramularia*-Arten (IRAN-*R. uredinicola*, RR-*R. rubella*, 89-*R. pratensis*, 90-*R. inaequalis*, 208-*R. grevilleana*).

Isolat	Mycel- Frischgewicht [mg/Kolben]	pH-Wert Kulturfiltrat	Kulturfiltrat			Mycel		
			Rubellin B [µg/Kolben]	Rubellin C [µg/Kolben]	Rubellin D [µg/Kolben]	Rubellin B [µg/Kolben]	Rubellin C [µg/Kolben]	Rubellin D [µg/Kolben]
IRAN	5350	8,5	355,8	883,3	1417,7	2187,5	1900,5	3237,7
RR	552	5,8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
89	2198	8,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
90	4839	7,7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
208	603	7,8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
38	1971	7,9	11,3	286,7	821,3	116,0	169,2	1098,5
55	1865	7,7	20,7	129,1	385,2	316,6	166,8	861,8
58	1562	8,1	1,5	36,6	186,7	0,4	3,3	15,2
79	3818*	7,8	22,0	490,4	1268,0	435,0	500,1	2078,8
101	1876	7,8	43,7	150,2	2931,9	185,6	46,4	934,2
102	1638	8,0	28,2	66,4	865,3	72,5	30,6	474,1
103	1934	7,9	165,6	552,9	4597,6	1601,9	473,2	3711,9
141	1764	8,1	8,7	124,0	475,6	19,5	25,6	199,5
197	2733	8,1	5,3	22,4	270,8	26,5	13,0	363,6
198	1881	8,1	8,2	243,4	755,5	78,9	60,9	372,9
200	1651	7,7	27,4	284,1	3955,6	147,0	85,7	663,6
43/3	1861	7,5	365,1	344,4	4097,6	3855,2	420,3	4584,7
86/1	1985	7,9	24,6	255,4	2158,1	386,9	135,2	1423,6
86/3	1916	7,8	12,2	481,6	842,3	169,0	426,4	1541,9
94/2	2241*	7,9	0,3	0,6	22,0	0,2	0,7	5,1
95/1	3861*	7,9	1,3	50,6	247,5	3,2	6,1	104,4

Tabelle A.12: Daten zur Wachstums- und Bildungskinetik bei *R. collo-cygni* (43/3). Dargestellt sind die Parameter Glucosekonzentration (Glc), verwendetes Kulturfiltrat (ml/Kulturkolben), pH-Wert, Frischgewicht (FG; mg/Kulturkolben), sowie die Hauptverbindungen (µg/Kulturkolben) Rubellin A - D. Weiterhin wurden die Werte für die Verbindungen addiert, die sich nicht-enzymatisch ineinander umwandeln lassen.

Kulturtag	Glc [mg/dl]	KF [ml]	pH	FG [mg]	Verbindung [µg/Kolben]				Zusammenfassung [µg/Kolben]	
					Rubellin A	Rubellin B	Rubellin C	Rubellin D	Rubellin B+D	Rubellin A+C
0	1190,5	100,0	6,5	0,0	1,5	112,2	n.n.	39,1	151,3	1,5
2	1161,4	99,0	6,5	0,0	17,4	420,8	n.n.	90,0	510,8	17,4
5	894,2	99,0	7,4	356,7	177,0	689,5	177,3	587,0	1276,5	354,3
7	687,7	98,7	7,4	504,7	171,9	1047,2	343,9	1144,1	2191,3	515,8
9	399,1	94,0	7,4	1253,0	126,2	1085,5	308,6	1402,5	2488,0	434,8
11	223,4	92,7	7,4	1728,3	235,4	1546,6	525,3	2459,1	4005,7	760,7
13	145,1	91,0	7,4	2204,3	309,5	2293,2	555,9	3206,9	5500,1	865,4
15	0,0	89,0	7,4	2298,0	185,2	2109,7	460,9	4265,1	6374,8	646,1
17	0,0	89,0	7,4	1794,0	164,9	2128,0	669,3	5075,2	7203,2	834,2
19	0,0	89,0	7,4	1698,3	103,4	1437,6	548,9	4422,5	5860,1	652,3
21	0,0	89,0	7,7	1686,6	96,5	1135,3	468,3	4594,6	5729,9	564,8
26	0,0	86,7	7,7	1594,7	35,6	603,3	539,6	4350,0	4953,3	575,2
29	0,0	86,7	7,7	1603,3	80,8	775,1	364,6	4160,2	4935,3	445,4

Tabelle A.13: Daten zur Wachstums- und Bildungskinetik bei *R. collo-cygni* (43/3). Detaillierte Produktionsmengen der Hauptverbindungen Rubellin A - D jeweils in Kulturfiltrat und Mycel.

Kulturtag	Mycel-Extrakt [$\mu\text{g/Kolben}$]				Kulturfiltrat-Extrakt [$\mu\text{g/Kolben}$]			
	Rubellin A	Rubellin B	Rubellin C	Rubellin D	Rubellin A	Rubellin B	Rubellin C	Rubellin D
0	1,5	112,2	n.n.	39,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2	17,4	225,2	n.n.	48,2	n.n.	195,6	n.n.	41,8
5	151,5	625,5	56,0	309,7	25,5	64,0	121,3	277,3
7	171,9	986,3	80,6	504,5	n.n.	60,9	263,3	639,6
9	126,2	997,9	129,3	863,5	n.n.	87,6	179,3	539,0
11	235,4	1443,7	141,3	1135,0	n.n.	102,9	384,0	1324,1
13	309,5	2106,8	178,6	1584,0	n.n.	186,4	377,3	1622,9
15	185,2	1943,5	257,6	2756,4	n.n.	166,2	203,3	1508,7
17	164,9	1967,8	225,0	2412,2	n.n.	160,2	444,3	2663,0
19	103,4	1362,7	167,3	2074,3	n.n.	74,9	381,6	2348,2
21	96,5	1095,1	273,0	3099,3	n.n.	40,2	195,3	1495,3
26	35,6	576,6	198,3	2244,3	n.n.	26,7	341,3	2105,7
29	80,8	750,7	217,0	2754,5	n.n.	24,4	147,6	1405,7

A. VI. prozentuale Zellvitalität (Zelllinien HIG-82, HT29, J774A.1)Tabelle A.14: Prozentuale Zellvitalität nach 24-stündiger Inkubation mit Rubellin D, Caeruleoramularin I, Chrysophanol, sowie Uredinorubellin I und II. Die jeweiligen Verbindungen wurden in den Konzentrationen 0, 2 und 10 μM unter Lichteinfluss bzw. Lichtausschluss getestet.

Zelllinie Verbindung	Zellvitalität [%]					
	Dunkeltoxizität			Phototoxizität		
	0 μM	2 μM	10 μM	0 μM	2 μM	10 μM
HIG-82						
Rubellin D	100 \pm 6,7	89,0 \pm 11,1	97,5 \pm 11,8	100 \pm 18,5	15,6 \pm 13,8	20,1 \pm 17,4
Caeruleoramularin I	100 \pm 5,0	101,2 \pm 8,4	102,3 \pm 8,2	100 \pm 9,2	111,2 \pm 13,4	111,2 \pm 15,0
Chrysophanol	100 \pm 13,5	100,9 \pm 12,4	107,8 \pm 10,0	100 \pm 14,5	99,8 \pm 12,8	125,0 \pm 5,9
Uredinorubellin I	100 \pm 10,2	95,2 \pm 9,1	91,3 \pm 5,4	100 \pm 6,4	12,4 \pm 15,6	11,0 \pm 10,0
Uredinorubellin II	100 \pm 11,3	88,6 \pm 4,8	89,2 \pm 11,1	100 \pm 16,2	11,2 \pm 27,0	10,5 \pm 9,2
HT29						
Rubellin D	100 \pm 11,2	83,0 \pm 4,2	79,1 \pm 11,6	100 \pm 11,3	93,0 \pm 18,7	94,1 \pm 34,2
Caeruleoramularin I	100 \pm 20,7	114,8 \pm 5,5	116,4 \pm 5,2	100 \pm 13,5	113,5 \pm 12,2	127,4 \pm 6,0
Chrysophanol	100 \pm 8,2	87,5 \pm 16,6	89,5 \pm 8,6	100 \pm 12,6	115,3 \pm 15,4	118,5 \pm 4,8
Uredinorubellin I	100 \pm 4,3	115,0 \pm 9,7	113,3 \pm 11,7	100 \pm 3,1	45,0 \pm 17,7	15,1 \pm 16,3
Uredinorubellin II	100 \pm 8,1	75,1 \pm 6,4	79,7 \pm 17,5	100 \pm 9,7	77,4 \pm 12,4	84,5 \pm 7,3
J774A.1						
Rubellin D	100 \pm 8,0	116,7 \pm 3,8	101,0 \pm 14,7	100 \pm 23,7	26,7 \pm 15,2	11,7 \pm 6,7
Caeruleoramularin I	100 \pm 5,7	93,6 \pm 6,2	92,5 \pm 4,8	100 \pm 0,1	105,6 \pm 11,2	62,9 \pm 44,8
Chrysophanol	100 \pm 4,7	99,0 \pm 4,4	88,3 \pm 7,3	100 \pm 12,6	103,9 \pm 19,7	27,7 \pm 23,7
Uredinorubellin I	100 \pm 7,5	84,0 \pm 11,5	68,1 \pm 7,8	100 \pm 21,5	22,1 \pm 7,2	9,3 \pm 9,3
Uredinorubellin II	100 \pm 9,4	92,3 \pm 10,8	90,0 \pm 11,6	100 \pm 6,6	9,2 \pm 7,8	8,7 \pm 4,5

A. VII. Antibiotische Effekte

Tabelle A.15: Antibiotische Effekte der Rubelline B - E sowie von Caeruleoramularin I, im Agar-Diffusionstest. Angegeben sind jeweils die Hemmhofdurchmesser [mm], wobei zwei Konzentrationen (2,0 und 0,2 mM; LM = DMSO/MeOH) getestet wurden. (p - partielle Wachstumsinhibierung, ¹⁾Referenzantibiotikum Ciprofloxacin 5 µg/ml in Aqua dest., ²⁾Amphotericin B 10 µg/ml in DMSO).

Verbindung	Rubellin B		Rubellin C		Rubellin D		Rubellin E		Caeruleoramularin I		Referenz	LM
Art	2,0 mM	0,2 mM	2,0 mM	0,2 mM	2,0 mM	0,2 mM	2,0 mM	0,2 mM	2,0 mM	0,2 mM		
<i>Bacillus subtilis</i> 6633	13,5	13	17	16	17	16,5	14p	12p	13	12,5p	29 ¹⁾	10
<i>Staph. aureus</i> SG 511 B3	13	12	16	15	17	16,5	13	10	13	11,5	18 ¹⁾	9,5
<i>E. coli</i> 458	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37 ¹⁾	0
<i>Pseud. aeruginosa</i> SG 137	0	0	0	0	12p	0	0	0	0	0	25 ¹⁾	0
<i>Pseud. aeruginosa</i> K799/61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	36p ¹⁾	10
<i>Staph. aureus</i> 134/94 MRSA	13,5	12	18	17	21	20	19	13	12,5	11	0 ¹⁾	9,5
<i>Enterococ. faecalis</i> 1528 VRSA	12,5	12	12p	13p	12	12	12,5	9,5	12,5	11	16,5 ¹⁾	10
<i>Mycobact. vaccae</i> 10670	13,5	13	16	19	22	18	32	17,5	14	0	24 ¹⁾	10
<i>Sporobolom. salmonicolor</i> 549	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	19p ²⁾	10
<i>Candida albicans</i> C.alb.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21 ²⁾	0
<i>Penicillium notatum</i> JP36	0	0	0	0	0	0	10,5	0	10,5	0	14 ²⁾	10

Tabelle A.16: Antibiotische Effekte der Rubelline C, D und E. Angegeben sind jeweils die minimalen Hemmkonzentrationen [MIC in µM], wobei das Referenzantibiotikum Ciprofloxacin (5 µg/ml) mitgetestet wurde.

Art	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>Enterococ. faecalis</i>	<i>Mycobac. smegmatis</i>	<i>Mycobact. aurum</i>	<i>Mycobact. vaccae</i>	<i>Mycobact. fortuitum</i>
Verbindung [µM]	6633	SG 511 B3	134/94 MRSA	1528 VRSA	SG 987	SB 66	10670	M.fort.
Rubellin C	6	12,5	12,5	100	12,5	12,5	12,5	12,5
Rubellin D	3	3	1,6	50	6	6	6	6
Rubellin E	100	100	100	>200	>200	>50	100	200
Ciprofloxacin	0,15	0,6	37,72	2,41	1,21	0,6	0,6	0,15

Tabelle A.17: Zusammenfassung der halbmaximalen Hemmkonzentrationen (ED₅₀) von Rubellin D an ausgewählten phytopathogenen Pilzen.

Art	ED ₅₀ [µg/ml]
<i>Aspergillus flavus</i>	28,3
<i>Botrytis cinerea</i>	115
<i>Drechslera avenae</i>	11,7
<i>Fusarium oxysporum</i>	29,8
<i>Penicillium italicum</i>	14,2
<i>Phytophthora sp.</i>	>200
<i>Pythium sp.</i>	50-75
<i>Rhizoctonia solani</i>	>20
<i>Verticillium dahliae</i>	95
<i>Verticillium fungicola</i>	12-20

A. VIII. PKS-Sequenzen

Tabelle A.18: Signifikante Alignments der jeweiligen sequenzierten PKS-Motive (NCBI-Datenbank, unter Verwendung von BLASTx (Altschul et al., 1997)).

Fragment	Zuordnung	Homologie zur Art	Referenznr.	Literatur
PKS 1u	PKS	<i>Beauveria bassiana</i>	ABD51494	Kroken et al., 2003 Amnuaykanjanasin et al., 2005
	reducing PKS-clade III	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	AAR90244	
	reducing PKS-clade III	<i>Xylaria sp.</i>	AAY68230	
PKS 2u	PKS	<i>Gibberella fujikuroi</i>	CAC44633	Kroken et al., 2003
	reducing PKS-clade II	<i>Gibberella moniliformis</i>	AAR92208	
PKS 1cc	PKS/NRPS	<i>Magnaporthe grisea</i>	CAG28797	Böhnert et al., 2004
	reducing PKS-clade II	<i>Gibberella moniliformis</i>	AAR92208	Kroken et al., 2003
PKS 2cc	reducing PKS-clade II	<i>Gibberella moniliformis</i>	AAR92208	Kroken et al., 2003
	PKS	<i>Acremonium sp.</i>	ABC94946	
PKS 3cc	PKS	<i>Acremonium sp.</i>	ABC94946	Kroken et al., 2003
	reducing PKS-clade I	<i>Gibberella moniliformis</i>	AAR92213	
PKS 4cc	PKS	<i>Aspergillus clavatus</i>	XP1274946	
	PKS	<i>Monascus pilosus</i>	ABA02239	
PKS 5cc	PKS	<i>Acremonium sp.</i>	ABC94946	Abe et al., 2002
	PKS	<i>Corollospora besarispora</i>	ABD47711	
	PKS	<i>Penicillium citrinum</i>	BAC20566	

a) Primer-Kombination KAF1/KAR1

PKS 1u (Rur1.16)

R. uredinicola IRAN (696 bp), kein Intron

Nukleotid-Sequenz:

GAGTGGCATGGGACGGGGACCAAAGTCGGCGACCCAATTGAGGCTCGTGCTATCTACAATGTGCTTGGCGCTGGCCGC
 ACTAAGCGTAATCCTCTGTACATCGGATCGGCAAAGACAAATGTGCGCCATCTGGAGAATGTCAGCGGTATCGTGTCGG
 TCATCAAAGCGACCTTGATGCTTGAGAAAGGTTTCATCCTCCCCAACATCAACTTCGAGAAGGCAAATGATGCTATTCC
 CCTGGATCAGTGAACATGAAGGTTCCAACGAGCCTGAAGCCGTGGCCGGCGAAGAAGAAGTATATCAGCATCAACAA
 CTTCCGGCTTTGGTGCTCAAACGCCCATTTGCGTCTTGCAGCGGACGCCTCTATCTATCAATGACCTCCCGATAGAGTCAC
 AGTCTGACTCTCTACAAAGCTCTTCGTTCTTTCTGCACATGACGAAGCGGCGGCTAAGGCTCTCACGAAGCAGCTGGG
 CATCTATGTCGAGCAGCATCCTGAGGTGTTCCAGAAGCGCCTTATTCCGGACATTGCTTACACTCTGGGGCAGCGTCGC
 TCGCACATGCCGTGGCGTCTAGCTGTTCCGGCGGGCACATGCAGTGAGTTGGCTATTGCTCTCAACAGTGCAGACAACA
 GGCCGATCCGTGCCTCCAAGTTCCTAAGCTGGCTTTCATCTTCTCCGGCCACGGCGCCCAATGG

Aminosäure-Sequenz (232 AS):

EWHTGTGTVGDPIEARAIYNVLGAGRTKRNP LYIGSAKTNVGHLENSGIVSVIKATLMLEKGFILPNINFEKANDAIPLDQW
 NMKVPTSLKPWPAPKKKYISINNF GFGGSNAHCYVLRQTPLSINDLPIESQSDSPTKLFVLSAHDEAAAKALTKQLGIYVEQHPE
 VFQKRLIRDIAITLGRSRHMPWRLAVPAGTCELAIALNSADNRPIRASKVPKLAFIFSGHGAQW

PKS 2u (Rur1.17)

R. uredinicola IRAN (710 bp), kein Intron

Nukleotid-Sequenz:

GAGGGGCACGGGACGGGGACGAAGGCTGGTGATCCAAAGGAAGCTGCGGCCATTTTGAATGTTTCGGACAGGAAGCCC
 GCGGCGAGCCCCTTTACGTCGGATCTGTCAAGACTGTATCGGCCACACCGAGGGTGCGGCTGGTCTTGCCGGTCTTTT
 CAAGGCTCTCGGAATTGTTCAAGAACGGAGTCATTCCCCCTAACCTGCTGTTCAACAAGCTCAACCCAGCCATTGAGCCT
 TTCTACAAGTACTTAAAGGTTCCACCACGCTCAGCAAGTACCCTACTCTCGCTGTAGATGTTCTCGCGGTGTCAGTGT
 GAACAGCTTCGGTTTCGGAGGATCCAACGCCCATGCTATTCTCGAGCAATATGACGCACCCGCGATCGAGGAGTCGGCC
 ATGACACCCGCATTTGCACCTTCGTCTTCTCGGCTGTGTCTGAGGTCAACCTCATCGCTCAGCTGGAGGCTTTCCGCCG
 TCACTTCGCAGAGAATGAGGATATCAACCTCGCCGACTTGCCCTACACGCTCCACGCACGCAGAAGTCAGCTGGCTGTC
 AAGGCTCCTTTGCTGCCACATCCATCGCTCAGCTGAAGACCAAGATTGACGAGAAGCTCGCAGAAGCAAAGGCGAAC
 GCCAGCAAGCCAATCGGTGTCCGTGCGAACACCAAGCTTGGGCTCCTGGTCTTCTTGGTGTCTTTTCCGGCCACGGCG
 CCCAGTGG

Aminosäure-Sequenz (240 AS):

EGHGTGKAGDPKEAAAILXCFGQEARGEPLYVGSVKTVIGHTEGAAGLAGLFAKALGIVQNGVIPPNNLNFKNLPAIEPFYKY
 LKVPTTSLKYPTLAVDVP RRVSNSF GFGGSNAHAILEQYDAPAI EESAMTPAFAPFVFSVAVSEVTLIAQLEAFAAHFAENEDI
 NLADLAYTLHARRSQLAVKASFAATSIAQLKTKIDEKLA EAKANASKPIGV RANTKLAAPGLLGVSFGHGAQW

b) Primer-Kombination KAF1/KAR2

PKS 1cc (Rcc2.1)

R. collo-cygni 43/3 (794 bp), 1 Intron

Nukleotid-Sequenz:

GAGGGGCATGGGACGGGGACGCGCGGGAGGtaagttcgccatcgccgggtcaatcccaatcccaccactgacttgacctttccctacagATCCAGTAG
 AGGCAGAAGCAATCCATTCTGCGTTCATGACATCTGATACCCTAGCATCCACTCAACGTCTGTACGTCGGCTCCATCAA
 AACTGTCCTTGGCCACACTGAGGGTACCGCTGGGCTTGCTGGCGTGATGAAAGCCATGCTTGCTATTGAGAACTCGTGT
 ATCCCTCCGAACCTTGCACTTGAATGAACCTGAACCTGCGGTCAAACCATTTCTACAAGAATCTAGAAATACCCCAAAACC
 ACTGCCATGGCCACAGCTCAACTCCGGTCAAGTGAGACGTGCGAGCGTGAACAGCTTCGGATTGGAGGTAGCAACG
 CCCACGCCATTATCGAGAGCTACGACAACAACAGGTGGCCACGAGTGATGATCGCACCATATTCCGTCCATTGTATT
 TTCGGCCGCGTCCGAGAAAGCGCTGCGAAGCAATCTTGAAGCCTATGTCAATACTTGGGATCAGCCCCGAGTCACATT
 GCTCCCAATCTGGCATAACCCCTACGCAGCAGACGTTGCTACTGCAATACCGTCTCGCGATTCCGGCAGCTGACTGTG
 AATCTTTGAGGGAGAACTTGTGATTTCATTGCAGGCAATGCCGTACAGCAAACAATGGAATCGTTAGGACCCTCTC
 AAAAATTGGCAGTGAGAGCACAAAGCATCCTCGGAGTCTTACCGGCCAGGGCGCCCAATGG

Aminosäure-Sequenz (244 AS):

EGHGTGTPAGDPVEAEIHS AFMTSDTLASTQRLYVGSIKTVLGHTEGTAGLAGVMKAMLAIQNSCIPPNNLHNLNPAVKP
 FYKNLEIPQNHCPWPQLNSGQVRRASVNSF GFGGSNAHAII ESYDNNQVATSDDRTIFGPFVFSAASEKALRSNLEAYVEYL
 SAPSHIAPNLAYTLRSRRSLQYRLAIPAADCESLREKLVDFIAGNAV TANNGIVRTL SKIGSESTSILGVFTGQGAQW

PKS 2cc (Rcc2.2)

R. collo-cygni 43/3 (723 bp), kein Intron

Nukleotid-Sequenz:

GAAGGGCACGGGACGGGGACGAAGGCTGGTGATCCCAAGGAAGCCGCGGCCATCTTCGAATGTTTGGTCAAGAGGCC
 CGCGACGAGCCGCTGTACGTCGGTTCTGTCAAGACCGTCATCGGTCACACCGAGGGTGCCGACGGGTGGCTGGCCTTT
 TCAAAGCTCTCGGAATTGTTCAAGACGGAGTTATTCGCCCTAACCTCTTGTTCAACAAGCTGAACCCAGCCATTGAGCCT
 TTCCACAAGTACCTGAAGGTTCCCACTGCTCTCAGCGAGTACCCAACCTCTCGCTGAAGGTGTTCCACGCCGTGTGAGTG
 TCAACTCATTCGGTTTCGGAGGCAGCAACGCCCACGCTATTCTGGAACAATACAATGGCCCAGTAGCCTCCGAGGAGTC
 CGCCTTGGTGCCTGCCTTTGCTCCCTTTGTCTTCTCGGCCGTTTCCGAGGTCACCTCATTTGCTCAGCTGGAAGCCTTCTC
 CAAGTACCTTGAGGCGAACGAGGATGTCAACCTCTCTGACCTGGCCTTTACACTTCACGCGAGAAGGAGTCAGTTGGCT
 GTCAAGACATCATTTGCTGCCTCTTCTGCCGCACAGCTCAAGACGAAGATCGACGAGAAGATCGCAGAAGCCAAGGCT
 AACGCCAGTAAGCCATTGGTGTTCGCGCCAACCTCCAAGCTTGTAACCTCTGGTATTCTCGGTGTCTTACCCGGCCAAG
 GCGCCCAAGTGG

Aminosäure-Sequenz (241 AS):

EGHGTGKAGDPKEAAIFECFGEARDEPLYVGSVKTVIGHTEGAAGLAGLFLKALGIVQNGVIPPNNLFLNKLNPAPIEPFHKY
 LKVPTALSEYPTLAEGVPRRVSVNSFGFGGSNAHAILEQYNGPVASEESALVPAFAPFVSAVSEVTLIAQLEAFSKYLEANED
 VNLSDLAFTLHARRSQLAVKTSFAASSAAQLKTKIDEKIAEAKANASKPIGVRANSKLVTGPILGVFTGQGAQW

PKS 3cc (Rcc2.3)

R. collo-cygni 43/3 (886 bp), 1 Intron

Nukleotid-Sequenz:

GAGTGGCATGGGACGGGGACAGCGGTTgtgggtaatcccagttatgagagcatagagcagttccagttctccacaacatccaaaacccatgctgacttttagGGT
 GATCCTACGGAAGCCAGTGCAATCGCTCGAGCCTTCGATCATGTTAGAACCAGAGAAGATCCGCTGTACGTGGGCGCC
 GTCAAAGCCAACGTCGGACATCTTGAGGGGTGTAGTGGTCTTGCCGGTGTAATCAAGGCTCTCCTCGTCTCGAAAAGG
 GGTATATCCCAACCAATCGCCGGCCTTGAAACGCTGAACAAGAAGTTGACACCTGAGAAGTGGAACATTTCGATTTCCTCA
 AGTCGGTCTAGCCTGGCCGTCGACGGGTCTTCGTCGAGCATGTGTCAATTTCGTTTCGGCTTTGGGGGGACCAATGCCACC
 GCGGTGCTAGACAATTGCGACTACCACTTGAGCATCGTCAGAAACCGACATGCCAATCGCGGTTTCATTACAAGACTCGG
 ATAGTACATCATCAGCTCCAACCTCCAACGGGGTCCACAGTAGCGACGACTTGGATCCTATCCCTGCAGAACACACAGAA
 TGGAGATTGTTCAACTCTAGCACGTCCCTCGGCGACCCCTAGGCTACTGCCATGGTCTGCGTTTCGATGAGCAAAGCGCA
 AAACGGCTGGGCGAGATGTACCTCAGCCGTTTCAATGACTTTAAAGACACTCTCGACGATGCTGCTTACGTGCTATCAC
 AACGACGGACACTCTTTCCCTGGCGAGGTTTGTCTGATTGGACAGGCTCAGCAACATCGAAATGGCTCGCCTCCCTC
 ACCAGCCCCCAA--AAAGGCTCTCGAAAATCGCCAAGTCGCATTTGTATTACcGGCCAAGGCGCCC

Aminosäure-Sequenz (270 AS):

EWHTGTAVGDPTEASAIARAFDHVRTREDPLYVGAVKANVGHLEGCSGLAGVIXXALLVLEKGYIPPIAGLETLNKKLTPE
 KWNIRFPQVGLAWPSTGLRRACVNSFGFGGTNATAVLDNCDYHLSIVRNHRNRLQSDSTSSAPTNSNGVHSSDDLPIPI
 AEHTNGDCSTLARPSATPRLLPWSAFDEQSAKRLGEMYLRSFNDFKDTLDDAAVLSQRRTLFPWRGFAVLDRLSNIEMAR
 LPSPAPKXKALENRQVAFVFTGQGA

PKS 4cc (Rcc2.5)

R. collo-cygni 43/3 (777 bp), kein Intron

Nukleotid-Sequenz:

GAAGCGCACGGGACGGGGACGTTGGCTGGAGATCCTCAAGAAGCAAAGGGCATCTACAGCGCATTCTTCGGTCATGTG
 AAGAGCGACGGCGAAGATGAGACTGATATTGGCGACGAAAAGCTGTTTTGCGGCTCCATCAAGACAATAATTGGTCAT
 CTAGAGGGATGCGCTGGTCTGGCAGGACTTCTCAAGGCATCACTCGCGGTGCAGCATGGGATAATTCTCCGAATTTGC
 TATTCAAGAGCTTAAACCCGGAGATCGAGCCTTATTACCACCGACTCCAGGTGCCACGAAAGCGATCCCATGGCCTGC
 TGTGCAAACTGTACGTCGTGCCAGTGTCAATAGCTTTGGTTTCGGCGGCACGAACTGCCACGCTATCATCGAGCAATAT
 GTAGAGCAACATCCGTCGTCTTCCCTGCCTCAAACCAAGATCGAGCAGACCACAGCTGCAGAGGACTGCTTCGCCGGGC
 CGTTACTCCTGTACGCGCAACGGGAACTTCCCTAGCAGCTAGTATTTGCCGTCTGGCCGATATGCTAGAGGAAGAAGA
 CAGTGTGGTTTCGCGTCGAGGATCTGGCATGGTTACACAAACGCGCCGGACCAAGTTTCAACAACGAATCTCTTTTCCA
 GGTGGGACAAGAAGTGGCTTGATCGAAGCTTTACGAGCGACGACTAAGTCAACTGCGGCATCTGAGATCGGAGTTCGT
 GCTCCCGCCAAGCTGAAGTGGCACACGCCTGGCATCCTTGGTATCTTACCGGCCAGGGCGCCCAATGG

Aminosäure-Sequenz (259 AS):

EAHGTGTLAGDPQEAKEYSAFFGHVKSDEDETDIGDEKLFCGSIKTIHLEGAGLAGLLKASLAVQHGIIPNNLFLKSLN
 PEIEPYHRLQVPTKAIPWPAVQTVRRASVNSFGFGGTNCHAIIEQYVEQHPSSSLPQTKIEQTAAEDCFAGPLLLSAATGTS
 LAASICRLADMLEEDSVVRVEDLAWFTQTRRTKFPQQRISFPGGTRSLGLEALRATTKSTAASEIGVRAPAKLKWHTPGILGIF
 TGQGAQW

PKS 5cc (Rcc2.8)

R. collo-cygni 43/3 (1234 bp), 4 Introns

Nukleotid-Sequenz:

GAAGCGCATGGGACGGGGACCATGGCgtaagtaaatcccagtagctgagagaccaattctctgcaatgtccaagatctgagctgactttaattcacctctagcgggttagt
 gaattgtatgactccgtggatgcacatttctaatacgtatactacctcagAGATCCAATCGAAGCCAACGCCATCATCTCGGCCCTCGGGGCGACGCGA
 TCTTCCACAGACCCGATTATTTGGGCTCGATCAAATCCAACATTTGGGTCAGtatgcgagcagggccggagaattgaagattactgccccatctt
 cactgcagcactgaaatcacatgctccctgcaacaacaacatctcgaataagaagtctatfcagatgacgtttggctctccgccaggctgcttctgttgggcttatagccccctctcagcgagcgtt
 gtctgctgtagccacaagcagagCCGACAATCTTCCTTTTCATCGACACTTGGGGACACTTgtggagcaattgctgacttgcgattcagacatacggaaactgc
 aagCGGTCTACTCTCAATCATCAAGGCCACCATGATGCTGGAACAACGAAGAGTATTGCCTACGTGTGGGTTCACAAAT
 TGAACCTGCTATTGGCCGCGGGGACAAGCTACGAGTATGTGGTGCCTATTCTAAgtcaaaagtctatactatcgacctgttaggtgtgaag
 gagtccatgcatggccgaccggggcaccagagcgatgctgtccaactacggctcagctccaccagttcaaatgtttgcagcggacctactaacgaagTTCAGGTTACGGAGG
 CAGCATGGCCGTTGCCTTGCTAGAAGCGTTTGAAGGTGACGAGGACAGCACGACGTCTCCATCATCTGCACTGACAACA
 TCCGACAATGAACTCCAGGAGCATCAAAATCATCTTTTCGTCTTCTCTGCACGATCCGAGTCGAGTCTGCGCTCTACCT
 GGCTGCGTTTGCTGAATATCTGGAGGACGTAGAGGACACACCTGGCAAGGCTCGTCACCTAGCGTACACTTTAGGCCGG
 CGTCGGACGAATTTCCATATCGAATCGGTGTACCCGCCAAGTCTTGGTTCAACTACGTGACCGACTGCGTGAGCATG
 TCAATTCTGCCTCGAAGATTACCCGCGCCAATCCCAAGTTACAGATTGCCTTCATGTTACCGGCCAGGGCGCCCAATG
 G

Aminosäure-Sequenz (236 AS):

EAHGTGTMDPIEANAIIISALGATRSSTDPIYLGSIKSNIGSPTIFLFDITWGHFGLLSIIKATMMLEQRRVLPTCGFQQLNPAIG
 RGDKLKRVCGAYSNSGYGGSMAVALLEAFEGDEDSTTSPSSALTTSDNELQEHQNHFLVFSARSESSLRSYLAFAEYLEDVE
 DTPGKARHLAYTLGRRRTNFPYRIGVPANCLVQLRDRLREHVNSASKIHRANPKLQIAFMFTGQGAQW

A. IX ITS-Sequenzen**ITS-Sequenzen (Primer-Kombination ITS5/ITS4 oder *ITS1/ITS4)***R. collo-cygni* 43/3 (556 bp)

GAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGAGCAATCCCG
 ACCTCCAACCCCTTTGTGAACGCATCATGTTGCTTCGGGGGCGACCCCTGCCGCGCAAGCGGCATTCCCCCGGAGG
 TCATTCAAACACTGCATTCTTACGTGCGAGTAAAAAGTTAATTTAATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTT
 CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
 TGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCT
 TGGTATTGGGCGTCGCGAGTCTCTCGCGCGCCTCAAAGTCTCCGGCTGAGCGGTTCTGCTCCCAGCGTTGTGGCA
 ACTATTGCGAGAGGAGTTCGAGTCGTGCGGCCGTTAAATCTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA
 CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

R. collo-cygni 200 (556 bp)

GAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGAGCAATCCCG
 ACCTCCAACCCCTTTGTGAACGCATCATGTTGCTTCGGGGGCGACCCCTGCCGCGCAAGCGGCATTCCCCCGGAGG
 TCATTCAAACACTGCATTCTTACGTGCGAGTAAAAAGTTAATTTAATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTT
 CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
 TGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCT
 TGGTATTGGGCGTCGCGAGTCTCTCGCGCGCCTCAAAGTCTCCGGCTGAGCGGTTCTGCTCCCAGCGTTGTGGCA
 ACTATTGCGAGAGGAGTTCGAGTCGTGCGGCCGTTAAATCTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA
 CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

R. collo-cygni 102 (556 bp)

GAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGAGCAATCCCG
 ACCTCCAACCCCTTTGTGAACGCATCATGTTGCTTCGGGGGCGACCCCTGCCGCGCAAGCGGCATTCCCCCGGAGG
 TCATTCAAACACTGCATTCTCAGTNGGAGTAAAAAGTTAATTTAATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTT
 CAGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
 TGAGCGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCT
 TGGTATTGGGCGTCGCGAGTCTCTCGCGCGCCTCAAAGTCTCCGGCTGAGCGGTTCTGCTCCCAGCGTTGTGGCA
 ACTATTGCGAGAGGAGTTCGAGTCGTGCGGCCGTTAAATCTTTCAAAGGTCGACCTCGGATCAGGTAGGGATA
 CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

R. collo-cygni 58 (556 bp)

GAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGGTCATTACTGAGTGAGGGAGCAATCCCCG
 ACCTCCAACCCCTTTGTGAACGCATCATGTTGCTTCGGGGGCGACCCTGCCGCGCAAGCGGCATTCCCCCGGAGG
 TCATTCAAACACTGCATTCTTACGTCGGAGTAAAAAGTTAATTTAATAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTT
 CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
 TGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCT
 TGGTATTGGGCGTCGCGAGTCTCTCGCGCGCCTCAAAGTCTCCGGCTGAGCGGTTTCGTCTCCAGCGTTGTGGCA
 ACTATTCGAGAGGAGTTCGAGTCGTCGCGGCCGTTAAATCTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA
 CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

R. collo-cygni 38 (556 bp)

GAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGAGCAATCCCCG
 ACCTCCAACCCCTCTGTGGACGCATCATGTTGCTTCGGGGGCGACCCTGCCGCGCAAGCGGCATTCCCCCGGAGG
 TCATTCAAACACTGCATTCTTACGTCGGAGTAAAAAGTTAATTTAATAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTT
 CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
 TGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCT
 TGGTATTGGGCGTCGCGAGTCTCTCGCGCGCCTCAAAGTCTCCGGCTGAGCGGTTTCGTCTCCAGCGTTGTGGCA
 ACTATTCGAGAGGAGTTCGAGTCGTCGCGGCCGTTAAATCTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA
 CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

R. collo-cygni 79 (557 bp)

GAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGAGCAATCCCCG
 ACCTCCAACCCCTTTGTGAACGCATCATGTTGCTTCGGGGGCGACCCTGCCGCGCAAGCGGCATTCCCCCGGAGG
 TCATTCAAACACTGCGATTCTTACGTCGGAGTAAAAAGTTAATTTAATAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTT
 TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT
 TTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGC
 TTGGTATTGGGCGTCGCGAGTCTCTCGCGCGCCTCAAAGTCTCCGGCTGAGCGGTTTCGTCTCCAGCGTTGTGGC
 AACTATTCGAGAGGAGTTCGAGTCGTCGCGGCCGTTAAATCTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAT
 ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

R. collo-cygni 55 (556 bp)

GAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGAGCAATCCCCG
 ACCTCCAACCCCTTTGTGAACGCATCATGTTGCTTCGGGGGCGACCCTGCCGCGCAAGCGGCATTCCCCCGGAGG
 TCATTCAAACACTGCATTCTTACGTCGGAGTAAAAAGTTAATTTAATAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTT
 CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
 TGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCT
 TGGTATTGGGCGTCGCGAGTCTCTCGCGCGCCTCAAAGTCTCCGGCTGAGCGGTTTCGTCTCCAGCGTTGTGGCA
 ACTATTCGAGAGGAGTTCGAGTCGTCGCGGCCGTTAAATTTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAC
 CCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

R. rubella RR (533 bp)*

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGATCCGTCCCGACCTCCAACCCCTTTGTGAACCCAT
 CTCGTTGCTTCGGGGGCGACCCTGCCGTCCGCGGCATTCCCCCGGAGGTCATCCAAACACTGCATTCTACGTC
 GGAGTAAAAAGTTAATTGAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
 AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTAT
 TCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCGTCGCGAGTCCCTCG
 CGCGCCTCAAAGTCTCCGGCTGAGCGGTCTCGTCTCCAGCGTTGTGGCAACTATTCGAGTGAGTTCGGAGCC
 GTCGCGGCCGTTAAATCTTTACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
 AGCGGAGGA

R. grevilleana 208 (557 bp)

GAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTTAGGGAGCAATCCCCG
 AACCTCCAACCCCTTTGTGAACACATCTTGTGCTTCGGGGGCGACCCTGCCGTTTCGAGCGGCATTCCCCCGGAG
 GTCATCAAAAACANTGCATTCTTACGTCGGAGTATAAAGTTAATTTAATGAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTT
 TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT
 TTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGC
 TTGGTATTGGGCGTCGCGAGTCTCTCGCGCGCCTCAAAGTNTCCGGCTAGGCGGTTTCGTCTCCAGCGTTGTGGC
 AACTATTCGAGAGGAGTTCGAGTCGTCGCGGCCGTTAAATCTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAT
 ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

R. pratensis 89 (555 bp)

GAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTTAGGGAGCAATCCCG
ACCTCCAACCCCTTTGTGAACACATCTTGTGCTTCGAGGGCGACCCTGCCGTTTCGCGGCATTCCCCCGGAGGTC
ATCAAAACANTGCATTCTTACGTCGGAGTATAAAGTTAATTTAATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT
GGCATCGATGAGGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG
AACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCTTG
GTATTGGGCGTCGCGAGTCTCTCGCGCGCCTTAAAGTCTCCGGCTGAGCGGTTTCGTCTCCAGCGTTGTGGCAAC
TATTTTCGAGTGGAGTTCGAGTCGTCGCGGCCGTTAAATCTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACC
CGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

R. uredinicola IRAN (532 bp)*

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTTAGGGATCAATCCCGACCTCCAACCCCTTTGTGAACACAT
CTTGTGCTTTGGGGGCGACCCTGCCGCTCGCGGCATTCCCCCAGAGATCATCAAAACACTGCATTCTTACGTC
GGAGTAAAAAGTTAATTTAATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTAT
TCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCGTCGCGAGTCCCTCG
CGCGCTCAAAGTCTCCGGCTGAGCGGTTTCGTCTCCAGCGTTGTGGCAACTATTTTCGAGTGGAGTTCGAGCCG
TCGCGGCCGTTAAATCTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAA
GCGGAGGA

R. inaequalis 90 (574 bp)

GAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGTCTTACCA
CCGGGATGTTTATAACCCCTTTGTGTCGACTCTGTTGCCTCCGGGGGCGACCCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGG
GTGGACACTCCAACTCTTGCCTAACTTTGCAGTCTGAGTAACTTAATTAATAAAATTTAACTTTTAAACAACGG
ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACT
CAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGCGTGCCTCAAAATCGACCGGTGGGTCTTCTGTCCCCTAA
GCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGTGTTCCGGAGGCTACGCCGTAAAACAACCCCATTTCTAAGGTTGACCT
CGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

Tabelle A.19: Verwendete Taxa zur Erstellung der phylogenetischen Dendrogramme. Dargestellt sind die jeweiligen Arten mit den dazugehörigen Referenznummern aus der NCBI-Datenbank.

Taxon		Stamm	Referenznummer
<i>Cercospora</i>	<i>caricis</i>	CG672	AF284390
<i>Cercospora</i>	<i>kikuchii</i>	DLS5070-3A	AY373573
<i>Cercospora</i>	<i>nicotianae</i>		DQ059569
<i>Cladosporium</i>	<i>allii-cepae</i>		AB026160
<i>Cladosporium</i>	<i>cladosporioides</i>	UWFP863	AY213641
<i>Cladosporium</i>	<i>sphaerospermum</i>	aurim1224	DQ093662
<i>Cladosporium</i>	<i>tenuissimum</i>	aurim1176	DQ093663
<i>Davidiella</i>	<i>tassiana</i>	T3729	EF104242
<i>Mycosphaerella</i>	<i>aerola</i>	bar clone Dwd-1	DQ631897
<i>Mycosphaerella</i>	<i>arachidis</i>	USGA05-AP4M3	EF157739
<i>Mycosphaerella</i>	<i>brassicicola</i>	IOP99156	AF297227
<i>Mycosphaerella</i>	<i>citri</i>	GS8	AF181704
<i>Mycosphaerella</i>	<i>fijiensis</i>		AF181705
<i>Mycosphaerella</i>	<i>fragariae</i>		AF297235
<i>Mycosphaerella</i>	<i>fragariae</i>		AF297237
<i>Mycosphaerella</i>	<i>graminicola</i>	T1	AF181693
<i>Mycosphaerella</i>	<i>molleriana</i>	CMW8578	AY38215
<i>Mycosphaerella</i>	<i>musicola</i>	CMW6365	AF509735
<i>Mycosphaerella</i>	<i>musicola</i>		AF181706
<i>Mycosphaerella</i>	<i>nubiliosa</i>	CMW3032	AY38216
<i>Mycosphaerella</i>	<i>rubella</i>	CBS288.49	AY490767
<i>Mycosphaerella</i>	<i>rubella</i>		AF362060
<i>Passalora</i>	<i>henningsii</i>		AF284389
<i>Phaeoramularia</i>	<i>manihotis</i>		AF284385
<i>Ramularia</i>	<i>aplospora</i>	CBS545.82	EU040238
<i>Ramularia</i>	<i>carthami</i>	s-527	DQ466083
<i>Ramularia</i>	<i>coleosporii</i>	KACC42485	EF535674
<i>Ramularia</i>	<i>collo-cygni</i>		AJ536191
<i>Ramularia</i>	<i>collo-cygni</i>		AF173310
<i>Ramularia</i>	<i>collo-cygni</i>		AJ536178
<i>Ramularia</i>	<i>eucalypti</i>	CPC13304	EF394862
<i>Ramularia</i>	<i>lamii</i> var. <i>lamii</i>	KACC42534	EF535688
<i>Ramularia</i>	<i>miae</i>	CBS120121	DQ885902
<i>Ramularia</i>	<i>pratensis</i> var. <i>pratensis</i>	CPC11294	EU019284
<i>Ramularia</i>	<i>sp.</i>	5P	AY598873
<i>Ramularia</i>	<i>sp.</i>	ascomyc2	AJ417469
<i>Ramularia</i>	<i>sp.</i>	KC1	AF222848
<i>Ramularia</i>	<i>sphaeroidea</i>	STE-U5242	AY352584
<i>Ramularia</i>	<i>uredinicola</i>	KACC42447	EF535658
<i>Ramularia</i>	<i>uredinicola</i>	KACC42535	EF535689
<i>Septoria</i>	<i>passerinii</i>	ATCC26516	AF181697

Tabelle A.20: Verwendete Taxa zur Erstellung der PKS-Dendrogramme. Dargestellt sind die jeweiligen Arten mit den dazugehörigen Referenznummern aus der NCBI-Datenbank, sowie die Zuordnung entsprechend des PKS-Typs nach Kroken et al. (2003) bzw. Amnuaykanjanasin et al. (2005).

Taxon		PKS-Typ	Referenznummer
<i>Gibberella</i>	<i>moniliformis</i>	Reducing-PKS-clade I	AAR92209
<i>Gibberella</i>	<i>moniliformis</i>	Reducing-PKS-clade I	AAR92212
<i>Botryotinia</i>	<i>fuckeliana</i>	Reducing-PKS-clade I	AAR90237
<i>Xylaria</i>	<i>sp.</i>	Reducing-PKS-clade I	AY971512
<i>Aspergillus</i>	<i>terreus</i>	Reducing-PKS-clade I	AAD34559
<i>Penicillium</i>	<i>citrinum</i>	Reducing-PKS-clade I	BAC20566
<i>Cochliobolus</i>	<i>heterostrophus</i>	Reducing-PKS-clade I	AAB08104
<i>Mycosphaerella</i>	<i>zeae-maydis</i>	Reducing-PKS-clade I	AAR85531
<i>Alternaria</i>	<i>solani</i>	Reducing-PKS-clade II	BAD83684
<i>Gibberella</i>	<i>moniliformis</i>	Reducing-PKS-clade II	AAR92217
<i>Botryotinia</i>	<i>fuckeliana</i>	Reducing-PKS-clade II	AAR90239
<i>Magnaporthe</i>	<i>grisea</i>	Reducing-PKS-clade II	CAG28798
<i>Gibberella</i>	<i>moniliformis</i>	Reducing-PKS-clade II	AAR92208
<i>Aspergillus</i>	<i>terreus</i>	Reducing-PKS-clade II	AAD39830
<i>Penicillium</i>	<i>citrinum</i>	Reducing-PKS-clade II	BAC20564
<i>Cochliobolus</i>	<i>heterostrophus</i>	Reducing-PKS-clade III	AAR90257
<i>Xylaria</i>	<i>sp.</i>	Reducing-PKS-clade III	AAY68230
<i>Botryotinia</i>	<i>fuckeliana</i>	Reducing-PKS-clade III	AAR90244
<i>Neurospora</i>	<i>crassa</i>	Reducing-PKS-clade III	EAA28899
<i>Botryotinia</i>	<i>fuckeliana</i>	Reducing-PKS-clade IV	AAR90246
<i>Xylaria</i>	<i>sp.</i>	Reducing-PKS-clade IV	AAY32931
<i>Xylaria</i>	<i>sp.</i>	Reducing-PKS-clade IV	AAY27746
<i>Cochliobolus</i>	<i>heterostrophus</i>	Reducing-PKS-clade IV	AAR90269
<i>Cochliobolus</i>	<i>heterostrophus</i>	Reducing-PKS-clade IV	AAR90267
<i>Penicillium</i>	<i>griseofulvum</i>	6-MSAS-PKS-clade	CAA39295
<i>Byssosclamyces</i>	<i>nivea</i>	6-MSAS-PKS-clade	AAR48943
<i>Xylaria</i>	<i>sp.</i>	6-MSAS-PKS-clade	AAY46446
<i>Nostoc</i>	<i>sp.</i>	bakterielle PKS	AAF15892
<i>Sorangium</i>	<i>cellulosum</i>	bakterielle PKS	AAF62885
<i>Sorangium</i>	<i>cellulosum</i>	bakterielle PKS	AAK19883
<i>Nodulisporium</i>	<i>sp.</i>	non-reducing PKS	AAD38786
<i>Xylaria</i>	<i>sp.</i>	non-reducing PKS	AAM93545
<i>Emericella</i>	<i>nidulans</i>	non-reducing PKS	1905375A
<i>Emericella</i>	<i>nidulans</i>	non-reducing PKS	AAA81586
<i>Aspergillus</i>	<i>parasiticus</i>	non-reducing PKS	Q12053
<i>Gibberella</i>	<i>moniliformis</i>	PKS-Typ ?	AAD43562
<i>Gibberella</i>	<i>moniliformis</i>	PKS-Typ ?	AAR92214
<i>Xylaria</i>	<i>sp.</i>	PKS-Typ ?	AY971872

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen April 2004 und März 2008 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter der Betreuung von Herrn HDoz. habil. Dr. Bernd Liebermann angefertigt. An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater für die Vergabe dieses interessanten Themas bedanken, vor allem aber für sein großes Engagement, sowie für die fachliche und zeitintensive Unterstützung. Mein Dank gilt ferner dem ehemaligen Lehrstuhlinhaber der Pharmazeutischen Biologie Herrn Prof. Dr. J. Heilmann (Universität Regensburg) und natürlich dem derzeitigen Inhaber Prof. Dr. T. Winckler für die unkomplizierte Übernahme und vor allem die Weiterführung meiner Stelle.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. W. Günther (Institut für Organische und Makromolekulare Chemie, FSU Jena) für die zahlreichen und zeitaufwendigen NMR-Messungen und seine hilfreichen Diskussionen zur Spektrenauswertung und Strukturaufklärung. Ich möchte Frau A. Perner (Hans-Knöll-Institut Jena) für die Messung aller MS-Spektren, Herrn Dr. J. Wange (Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, FSU Jena) für die Durchführung der Drehwertbestimmungen und Frau G. Sentis (Institut für Organische und Makromolekulare Chemie, FSU Jena) für die Messung der IR-Spektren danken. Für die Unterstützung bei der IUPAC-Benennung danke ich Herrn Dr. U. Roessler (Fachinformationszentrum Chemie GmbH, Berlin).

Ich möchte mich bei allen Wissenschaftlern und Kollegen, die mit der Durchführung der biologischen Assays einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben bedanken. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. I. Heiser (Institut für Phytopathologie, TU München-Weihenstephan) für die Untersuchungen zur photodynamischen Aktivität. Weiterhin danke ich in diesem Zusammenhang Herrn Dr. F. Gaube (FSU Jena), Herrn Dr. M. Dahse (Hans-Knöll-Institut Jena), Herrn Prof. Dr. Dr. M. Gareis (Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel Kulmbach), Herrn Dr. M. Pickhardt (Max-Planck-Institut Hamburg) und Frau Dr. S. Gräfe (Biolitec AG Jena) für die Zytotoxizitäts- und Antiproliferationsassays, weiterhin Frau Dr. M. Schmidtke (Institut für Virologie und antivirale Therapie, FSU Jena) für die Tests auf antivirale Effekte. Mein Dank gilt ferner Frau U. Wohlfeld, Frau Dr. U. Möllmann (beide Hans-Knöll-Institut Jena), Frau Dr. M. Chrysai (Agricultural University Athens) bzw. Herrn Dr. B. Gitter (Biolitec AG), welche die antimikrobiellen Assays der Substanzen durchgeführt haben.

Frau Dr. E. Sachs und Frau E. Tessenow (Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Kleinmachnow) danke ich für die Durchführung der biologischen Tests an *Hordeum vulgare* sowie für die Bereitstellung der *Ramularia*-Pilzisolat. In diesem Zusammenhang sei auch Herrn Prof. Dr. U. Braun (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) für die Bereitstellung des Isolats von *R. uredinicola* erwähnt. Für die wiederholte Zusendung von befallenem Blattmaterial danke ich Herrn Dr. H. Huss (Bundesanstalt für Pflanzenbau, Versuchsstation Stadl-Paura, Österreich) an erster Stelle, sowie Herrn Dr. H. Bistrich (Saatzucht Donau Ges. mbH & Co. KG) und Dr. J. Großer (Lochow - Petkus GmbH). Weiterhin möchte ich mich bei meinem Kollegen und langjährigem Freund Dr. Harald Kellner (University of Michigan, USA) für die vielen fachlichen Anregungen, Diskussionen und vor allem die Arbeiten rund um die Thematik Sequenzierung, Stammbaumberechnung und PKS-Gene bedanken. Ich möchte mich ganz herzlich für das phantastische Arbeitsklima bei allen Mitarbeitern vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie bedanken, wobei mein ganz besonderer Dank Frau E. Hänert für ihre hervorragende technische Beratung und Anleitung im Labor, sowie die vielen netten Teegespräche in den Pausen, gilt. Den beiden Kollegen Annika Bilzer und Dr. Oliver Siol danke ich für die vielen hilfreichen Tipps im molekulargenetischen Laboralltag. Bedanken möchte ich mich außerdem bei den beiden *Ramularia*-Diplomanden Kai-Uwe Schmidtke und Susann Haase für ihre wertvolle Arbeit auf diesem Arbeitsgebiet. Bei den Kollegen und Mitarbeitern Heidi Graf, Dr. Bärbel Schubert, Dr. Friedemann Gaube, Annika Bilzer, Katrin Bauer, Dr. Oliver Siol und Moustapha Boutliliss bedanke ich mich für sehr angenehme und lehrreiche Tage bei der Betreuung in den Studentenpraktika. Im Besonderen danke ich den Wahlpflichtfach-Studenten C. Kolbe, C. Triesch, R. Otto, K. Pasold, C. Reim, E. Lehmann, T. Möller, A. Ginko, A. Krämer und I. Steinkopf für ihr Mitwirken an den Teilprojekten „MCF-7-Proliferation“ und „Isolierung neuer Anthrachinon-Derivate“. Abschließend danke ich Dr. Friedemann Gaube, Dr. Harald Kellner und Christina Braun für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Lebensgefährtin Yvonne Venus, die mir über den gesamten Zeitraum dieser Arbeit jegliche Unterstützung zu Teil werden ließen und insbesondere in der Schlussphase unter erschwerten Bedingungen sehr viel Verständnis für mich aufgebracht hat.

Liste wissenschaftlicher Publikationen und Tagungsbeiträge

- Miethbauer S., I. Heiser and B. Liebermann** (2003): The phytopathogenic fungus *Ramularia collo-cygni* produces biologically active rubellins on infected barley leaves. *Journal of Phytopathology* 151 (11-12): 665-668.
- Miethbauer S., I. Heiser, E. Sachs, B. Liebermann** (2004): Anthraquinone derivatives biosynthesized by *Ramularia collo-cygni* caused the barley leaf spot disease. *Proceedings of the 2nd International Workshop on Barley Leaf Blights*. Aleppo, Syrien, 7.-11. April 2002, 376-380.
- Heiser I., M. Hess, K.-U. Schmidtke, U. Vogler, S. Miethbauer, B. Liebermann** (2004): Fatty acid peroxidation by rubellin B, C and D, phytotoxins produced by *Ramularia collo-cygni* (Sutton et Waller). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64 (3): 135-143.
- Huss H., B. Liebermann, S. Miethbauer** (2005): Eine erstzunehmende Krankheit auch bei Hafer und Weizen: Weitere Ausbreitung der Sprengelkrankheit. *Der Pflanzenarzt* 58 (9-10): 8-10.
- Miethbauer S., S. Haase, K.-U. Schmidtke, W. Günther, I. Heiser, B. Liebermann** (2006): Biosynthesis of photodynamically active rubellins and structure elucidation of new anthraquinone derivatives produced by *Ramularia collo-cygni*. *Phytochemistry* 67 (12): 1206-1213.
- Liebermann B., W. Günther, S. Miethbauer** (2007): Biosynthesis of the rubellins, produced by the phytopathogenic fungus *Ramularia collo-cygni*. *Proceedings of the 1st European Ramularia Workshop*, Göttingen, 13.-14. März 2006, 63-65.
- Miethbauer S., W. Günther, I. Heiser, B. Liebermann** (2007): The phytopathogenic fungus *Ramularia collo-cygni* produces different anthraquinone derivatives (rubellins) with photodynamic activity. *Proceedings of the 1st European Ramularia Workshop*, Göttingen, 13.-14. März 2006, 67-70.
- Miethbauer S., W. Günther, B. Liebermann** (2008): Rubellins were biosynthesised by *Ramularia collo-cygni* via the polyketide pathway. *Proceedings of the 3rd International Workshop on Barley Leaf Blights*, Edmonton, Canada, 23.-27. Juli 2006, 150-152.
- Miethbauer S., W. Günther, I. Heiser, B. Liebermann** (2008): *Ramularia collo-cygni* the causer of a leaf spot disease on cereals produces different rubellins with photodynamic activity. *Proceedings of the 3rd International Workshop on Barley Leaf Blights*, Edmonton, Canada, 23.-27. Juli 2006, 147-149.

Miethbauer S., W. Günther, K.-U. Schmidtke, I. Heiser, S. Gräfe, B. Gitter, B. Liebermann (2008): Uredinorubellins and caeruleoramularin, novel anthraquinone derivatives produced by two species of the genus *Ramularia*. *Journal of Natural Products* (published on web 08.07.2008).

Miethbauer S., F. Gaube, U. Möllmann, H.-M. Dahse, M. Schmidtke, M. Gareis, B. Liebermann (2008): Effects of rubellins and caeruleoramularin produced by the genus *Ramularia*. *Planta Medica* (in Vorbereitung).

Tagungsbeiträge (Poster)

Miethbauer S., I. Heiser, E. Sachs, B. Liebermann (2002): Anthraquinone derivatives biosynthesized by *Ramularia collo-cygni* cause the barley leaf spot disease. *2nd International Workshop on Barley Leaf Blights*. Aleppo, Syrien, 7.-11. April.

Miethbauer S., W. Günther, I. Heiser, B. Liebermann (2006): The phytopathogenic fungus *Ramularia collo-cygni* produces different anthraquinone derivatives (rubellins) with photodynamic activity. *1st European Ramularia Workshop*, Göttingen, 13.-14. März.

Liebermann B., W. Günther, S. Miethbauer (2006): Biosynthesis of the rubellins, produced by the phytopathogenic fungus *Ramularia collo-cygni*. *1st European Ramularia Workshop*, Göttingen, 13.-14. März.

Heiser I., S. Miethbauer, K.-U. Schmidtke, M. Heß, B. Liebermann (2006): Phytotoxins from *Ramularia collo-cygni* - mode of action and contribution to pathogenicity. *1st European Ramularia Workshop*, Göttingen, 13.-14. März.

Miethbauer S., W. Günther, B. Liebermann (2006): Rubellins were biosynthesised by *Ramularia collo-cygni* via the polyketide pathway. *3rd International Workshop on Barley Leaf Blights*, Edmonton, Canada, 23.-27. Juli.

Miethbauer S., W. Günther, I. Heiser, B. Liebermann (2006): *Ramularia collo-cygni* the causer of a leaf spot disease on cereals produces different rubellins with photodynamic activity. *3rd International Workshop on Barley Leaf Blights*, Edmonton, Canada, 23.-27. Juli.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sebastian Miethbauer
Geburtsdatum: 29. September 1976
Geburtsort: Erfurt
Adresse: Dornburger Strasse 75, 07743 Jena
Kinder: Johannes Emil Venus, geb. am 16. Januar 2008

Schulbildung

09/1983 - 08/1991 Polytechnische Oberschule „Arthur Becker“ in Erfurt
09/1991 - 08/1993 Erweiterte Oberschule „Gotthold Ephraim Lessing“ in Erfurt
09/1993 - 06/1995 Albert-Schweitzer-Gymnasium in Erfurt
06/1995 Allgemeine Hochschulreife/Abitur

Ersatzdienst

08/1995 - 10/1996 Zivildienst, Klinikum Erfurt GmbH,
Bereich: Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Studium

10/1996 - 08/2002 Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
10/1996 - 09/1998 Grundstudium
10/1998 - 08/2002 Fachstudium Ökologie, Mikrobiologie, Botanik und Umweltrecht
10/2000 - 08/2002 Diplomarbeit (Institut für Pharmazie)
08/2002 Abschluss: Diplom Biologe
09/2002 - 03/2004 wissenschaftliche Hilfskraft, Institut für Pharmazie
seit 04/2004 wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Arbeitsgruppe: HDoz. Dr. B. Liebermann

Jena, 30. April 2008

Ehrenwörtliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät (Friedrich-Schiller-Universität Jena) unter Anleitung von Herrn HDoz. Dr. Bernd Liebermann angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe, wobei mir die in der Danksagung erwähnten Personen unterstützend bei den aufgeführten Untersuchungen geholfen haben. Mir ist die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt. Weiterhin versichere ich, dass diese Arbeit noch an keiner anderen Hochschule als Dissertation oder Prüfungsleistung vorgelegt wurde. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Jena, 30. April 2008

Sebastian Miethbauer

Thesen zur Dissertation:

Isolierung, Strukturaufklärung und Biosynthese phytotoxisch wirksamer Anthrachinon-Derivate produziert von *Ramularia collo-cygni* und *R. uredinicola*

Als Verursacher der Sprenkelkrankheit der Gerste wurde 1987 der Pilz *Ramularia collo-cygni* SUTTON & WALLER beschrieben. Aufgrund von Ertragseinbußen (bis zu 16 %) bestand ein großer Forschungsbedarf, inwieweit Phytotoxine involviert sind.

Mehrere rot und gelb gefärbte Haupt- und Nebenverbindungen konnten isoliert, strukturell charakterisiert und der Stoffklasse der Anthrachinone zugeordnet werden. Vier dieser Verbindungen (Rubellin A - D) wurden bereits aus dem phytopathogenen Pilz *Mycosphaerella rubella* NIESSL beschrieben. Rubellin E, F und 14-Dehydrorubellin D sowie die blau gefärbten Verbindungen Caeruleoramularin I und II mit einer veränderten anthranoiden Grundstruktur wurden bisher nicht beschrieben.

In einem *Screening* konnte die Bildung der Rubelline in allen Stämmen von *R. collo-cygni*, sowie einer weiteren *Ramularia*-Art nachgewiesen werden. Über ITS-Sequenzierungen konnte die phylogenetische Stellung der untersuchten *Ramularia*-Arten neben der morphologischen Zuordnung bestätigt werden. Die phylogenetische Analyse der Sequenzen zeigte eine deutliche Zuordnung der *Ramularia*-Arten in ein einheitliches *cluster* (inkl. einiger *Mycosphaerella*-Arten).

Der *In-Vivo*-Nachweis der Rubelline A - D aus infiziertem Blattmaterial deckt die Bedeutung dieser Verbindungen für die Pathogenese der *Ramularia-leaf-spot-disease* auf. Saug- und Inokulationsversuche an Wirtspflanzen sowie verschiedene *In-Vitro*-Experimente zeigten, dass dem Wirkmechanismus der Rubelline eine photodynamische Aktivität zugrunde liegt. Es wird hauptsächlich Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) generiert.

Die hyperparasitäre Art *Ramularia uredinicola* KHODAP. & U. BRAUN weist ein ähnliches Rubellinspektrum auf, außerdem konnten zwei bekannte Anthrachinone (Chrysophanol, Helminthosporin) sowie zwei neue Strukturen (Uredinorubellin I und II) isoliert werden. Diese vier Verbindungen wurden auch bei *R. collo-cygni* als Minorkomponenten nachgewiesen.

Mit dem Einbau von [1- ^{13}C]- und [2- ^{13}C]-markiertem Acetat wurde der Polyketid-Weg für die Biosynthese der Rubelline nachgewiesen. Der Einbau von [U- ^{13}C]-Glucose offenbart als Faltungsmuster der Polyketidkette den *Folding-F-Mode*. Die Minorkomponenten Chrysophanol und Helminthosporin sowie Uredinorubellin I und II fügen sich nahtlos in das Biosyntheseschema ein.

Mit degenerierten Primern konnten konservierte Motive der Ketoacylsynthase amplifiziert und die Zuordnung dieser Gene zur Gruppe der reduzierenden Polyketid-Synthasen (PKS) dargestellt werden. Die Ergebnisse sind jedoch nur erste Hinweise zur Lokalisierung relevanter Gene.

Die isolierten *Ramularia*-Metabolite wurden in umfassenden biologischen Untersuchungen auf ihr Wirkpotential getestet. Mit Ausnahme von Rubellin E zeigten sie antiproliferative sowie zytotoxische Effekte im mittleren μM -Bereich. Estrogenartige und antivirale (Ausnahme Chrysophanol) Effekte konnten nicht beobachtet werden. Eine Beeinflussung der Aggregation des Tau-Proteins, das bei der Pathogenese von Morbus Alzheimer eine wichtige Rolle spielt, wurde beobachtet, wobei jedoch zytotoxische Wirkungen in höheren Konzentrationen zu verzeichnen waren. Antibiotische Effekte konnten vor allem gegen Gram-positive Bakterien beobachtet werden, wobei sich für Rubellin B und D die stärkste Hemmwirkung offenbarte. Es konnte weiterhin eine deutliche Verstärkung der antibiotischen sowie der zytotoxischen Wirkung unter Lichteinfluß beobachtet werden.